

RNA-bindende Proteine involviert in der Selenoproteinbiosynthese

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. Yassin Mahdi

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Gudrun Brockmann
2. Prof. Dr. Ulrich Schweizer
3. Prof. Dr. Lutz Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 07. April 2016

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
Zusammenfassung.....	XV
1. Einleitung	1
1.1. Selen.....	1
1.1.1. Vom Toxin zum essentiellen Spurenelement	1
1.1.2. Aufnahme und Metabolismus von Selen	3
1.2. Selenoproteine, ihre Biosynthese und Faktoren	4
1.2.1. Überblick über die Selenoproteine und deren Funktionen.....	4
1.2.2. Selenocystein- und Selenoproteinbiosynthese.....	6
1.2.3. <i>tRNA selenocysteine associated protein of 43 kDa</i> (SECp43)	10
1.2.4. tRNA ^{Sec} -Modifikationen und die 2'-O-methylierte tRNA ^{Sec} -Isoform mcm ⁵ Um.....	11
1.2.5. <i>RNA methyltransferase like 1</i> (RNMTL1) als Kandidat für die tRNA ^{Sec} -2'-O-Methyltransferase	14
1.3. Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Materialien	18
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2. Enzyme	18
2.1.3. Geräte	18
2.1.4. Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits):	20
2.1.5. Software und Datenbanken	20
2.1.6. Vektoren/Plasmide	21
2.1.7. Antikörper	21
2.1.8. Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	22
2.1.9. Mauslinie	22
2.2. Methoden	24
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1.1. Genotypisierung der <i>Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}</i> -Mäuse.....	24

2.2.1.2. <i>Quantitative real time</i> PCR (qRT-PCR).....	25
2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Klonierung.....	25
2.2.1.4. Agarosegelelektrophorese	26
2.2.1.5. A-tailing und Ligation	26
2.2.1.6. Hitzeschock-Transformation	27
2.2.1.7. Ansetzen einer Übernachtskultur und Plasmid-DNA Isolation	27
2.2.1.8. Sequenzierung.....	28
2.2.1.9. Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	28
2.2.1.10. Klonierungen.....	28
<i>Klonierung von RNMTL1-Mutanten in lentivirale Vektor</i>	28
<i>Klonierung von RNMTL1-Mutanten in pcDNA3.1/V5-His-TOPO</i>	30
<i>Klonierung von RNMTL1 und Secp43 in den Expressionsvektor</i> <i>pET52b(+)</i>	30
2.2.1.11. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation.....	31
2.2.1.12. <i>In vitro</i> Transkription von <i>Secp43</i>	32
2.2.1.13. <i>In vitro</i> Translation von <i>SECp43</i>	32
2.2.1.14. <i>RNA electrophoretic mobility shift assay</i> (REMSA).....	33
2.2.1.15. Isolation von Mitochondrien	35
2.2.2. Probengewinnung und Probenaufbereitung	35
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.3.1. Proteinextraktion aus Gewebeproben.....	37
<i>Proteinextraktion mit Homogenisationspuffer</i>	37
<i>Proteinextraktion aus Zellkulturen</i>	37
<i>Proteinextraktion mit RIPA-Puffer</i>	38
2.2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	38
<i>Bradford-Methode</i>	38
<i>Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry-Methode)</i>	38
2.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.3.4. Coomassie-Färbung	40
2.2.3.5. Western Blot	40
<i>Transfer</i>	41
<i>Immundetektion</i>	41
2.2.3.6. Enzym-Aktivitätsassays	41

<i>Dejodase-Aktivitätsassay</i>	41
<i>Glutathion-Peroxidase (GPX) Aktivitäts-Assay</i>	44
<i>Thioredoxin-Reduktase (TXNRD) Aktivitäts-Assay</i>	45
<i>Transaminasenbestimmung im Serum</i>	47
2.2.3.7. Rekombinante Proteinexpression und -aufreinigung	48
<i>Rekombinante Proteinexpression</i>	48
<i>Lyse und Aufschluss der Bakterienzellen</i>	48
<i>Proteinaufreinigung über Nickel-NTA-Chromatographie</i>	49
2.2.4. Spektrometrische Konzentrationsbestimmung	51
2.2.5. Zellkultur	52
2.2.5.1. Kultivierung	52
2.2.5.2. Passagieren von eukaryontischen Zellen	53
2.2.5.3. Bestimmung der Zellzahl.....	53
2.2.5.4. Stabile Transfektion von <i>RNMTL1</i> -Mutanten in HepG2-Zellen	53
2.2.5.5. Lentivirale Transduktion von <i>RNMTL1</i> -Mutanten in HepG2-Zellen...	55
2.2.5.6. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	56
2.2.5.7. Natriumselenitstimulation für den Dejodase-Assay.....	56
3. Ergebnisse	58
3.1. SECp43 und die Selenoproteinbiosynthese.....	58
3.1.1. Charakterisierung der <i>Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}</i> -Mäuse.....	58
3.1.1.1. Leberspezifische Inaktivierung von SECp43 bei Mäusen	58
3.1.1.2. Einfluss der <i>Secp43</i> -Inaktivierung auf Selenoprotein-mRNA in der Leber	61
3.1.1.3. Einfluss der <i>Secp43</i> -Inaktivierung auf die Selenoproteinexpression der Leber.....	62
<i>Untersuchung der Selenoproteinexpression in der Leber</i>	62
<i>Sepp- und Se-Status im Serum</i>	63
3.1.1.4. Einfluss der <i>Secp43</i> -Inaktivierung auf die Selenoenzymaktivität in der Leber.....	64
3.1.1.5. Einfluss der <i>Secp43</i> -Inaktivierung auf die Selenoproteinbiosynthesefaktoren	64
3.1.2. Interaktionsstudien mit SECp43	66
3.1.2.1. Rekombinante Proteinexpression und –aufreinigung von SECp43...	66
3.1.2.2. SECp43-Synthese mittels <i>in vitro</i> Translation	68

3.1.2.3. Etablierung von Trit1 als Positivkontrolle für den REMSA	69
3.1.2.4. Bindungsanalysen von SECp43.....	70
<i>Bindungsanalyse von rekombinantem SECp43 mit tRNA^{Sec}</i>	70
<i>Bindungsanalyse von in vitro translatiertem SECp43 mit tRNA^{Sec}</i>	72
<i>Bindungsanalyse von SECp43 mit der eigenen mRNA</i>	73
3.2. Die Rolle von RNMTL1 in der Selenoproteinbiosynthese	75
3.2.1. Haben RNMTL1 überexprimierende HepG2-Zellen einen Einfluss auf die Expression stressbezogener Selenoproteine?	76
3.2.1.1. Transduktion von <i>RNMTL1</i> -Konstrukten mit folgender DIO1- Aktivitätsmessung in HepG2-Zellen zeigen keinen Effekt.....	76
3.2.1.2. Stabile Transfektion der <i>RNMTL1</i> -Konstrukte und deren Einfluss auf die Selenoproteinexpression in HepG2-Zellen	78
<i>Effekt von RNMTL1 auf die Dejodase-Aktivität</i>	78
<i>Einfluss von RNMTL1 auf die Selenoproteinexpression</i>	80
3.2.2. Bindungsanalyse von RNMTL1 mit der tRNA ^{Sec}	82
3.2.2.1. Expression und Aufreinigung von rekombinanter RNMTL1	82
3.2.2.2. Bindet RNMTL1 an die tRNA ^{Sec} <i>in vitro</i> ?.....	84
3.2.3. RNMTL1-Transport in Mitochondrien	85
4. Diskussion	88
4.1. SECp43 als potenzieller Biosynthesefaktor bei der Selenoproteinbiosynthese	88
4.1.1. Versuche zur Inaktivierung von <i>Secp43</i>	88
4.1.2. Einfluss der <i>Secp43</i> -Inaktivierung auf die hepatische Selenoproteinexpression	89
4.1.3. Rekombinante Expression und Aufreinigung von SECp43 und dessen Interaktion mit tRNA ^{Sec} bzw. mRNA ^{SECp43} <i>in vitro</i>	91
4.1.3.1. Rekombinante Expression und Aufreinigung	91
4.1.3.2. Interaktion von SECp43 mit der tRNA ^{Sec} <i>in vitro</i>	92
4.1.3.3. Interaktion von SECp43 mit der eigenen mRNA ^{SECp43} <i>in vitro</i>	94
4.1.4. <i>Secp43</i> -Mutationen zeigen keine Effekte auf die Selenoproteinexpression: mögliche Ursachen	95
4.1.5. Ausblick zur Analyse der Rolle von SECp43 in der Selenoproteinbiosynthese	97
4.2. RNMTL1 und die Selenoproteinbiosynthese.....	98

4.2.1. RNMTL1-Konstrukte überexprimierende HepG2-Zellen zeigen nicht den erwarteten Effekt auf die Expression stressbezogener Selenoproteine...	98
4.2.2. Rekombinante Expression und Aufreinigung von RNMTL1 und Interaktionsstudie mit der tRNA ^{Sec} <i>in vitro</i>	100
4.2.2.1. Rekombinante Expression und Aufreinigung	100
4.2.2.2. Interaktion von RNMTL1 mit der tRNA ^{Sec} <i>in vitro</i>	101
4.2.3. RNMTL1 wird in das Mitochondrium transportiert.....	101
4.2.4. RNMTL1 ist nicht die vermutete 2'O-Methyltransferase der tRNA ^{Sec} -Isoform mcm ⁵ Um	102
5. Schlussfolgerung	103
6. Literaturverzeichnis	105
7. Anhang	113
Liste der Publikationen und Poster	114
Danksagung	115
Erklärung.....	117

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FCS	fetales Kälberserum
μ	Mikro	<i>fl</i>	<i>floxed</i> (<i>loxP</i> flankiert)
ψ	Pseudouridin	Fwd	<i>forward</i>
ΔΨ	Membranpotenzial	FTSJ1	<i>FtsJ RNA methyltransferase homolog 1</i>
A	Adenosin	g	Gramm / Erdbeschleunigung
Abb.	Abbildung	G	Guanosin
Alb	Albumin	GPX	Glutathionperoxidase
APS	Ammoniumpersulfat	GR	Glutathionreduktase
AS	Aminosäure	GSH	Glutathion
AT(M,D)P	Adenosintri(mono-,di-)phosphat	GS-SG	(oxidiertes) Diglutathion
B	Agarosebead-Kontrolle	h	Stunde
Bp	Basenpaare	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Bp.D	Bindepuffer D	His	Histidin
BSA	Serumalbumin, Rind	I	Jod
cDNA	<i>complementary DNA</i>	i ⁶ A	Isopenenyladenosin
cpm	<i>counts pro Minute</i>	IVT	<i>in vitro</i> Translation
CT	<i>cycle of threshold</i>	kb	Kilobasen
Cys	Cystein	KBD	<i>Kashin Beck Disease</i> (Erkrankung)
Cyt	Cytosol	K _D	Dissoziationskonstante
dH ₂ O	destilliertes Wasser	kDA	Kilodalton
Del	Deletion	KL	klares Lysat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	KO	<i>knockout</i>
DF	Durchfluss	L	Liter
DIO	Dejodase	m	Milli
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	M	Molar
DMSO	Dimethylsulfoxid	m ¹ A	Methyladenosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mcm ₅ U	5-Methoxycarbonylmethyluridin 34
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	mcm ₅ Um	5-Methoxycarbonylmethyluridin-2'-O-Methyluridin 34
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)	Mem	Membran
DTT	Dithiothreitol	min	Minute
E	Eluat	Mito	Mitochondrium
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i>
EFSec	<i>Sec-specific elongation factor</i>	n	Nano
eIF4a3	<i>eukaryotic Initiation Factor 4a3</i>	N	Normal
ER	Endoplasmatisches Retikulum	Na ₂ SeO ₃	Natiumselenit
<i>et al.</i>	und andere		

Abkürzungsverzeichnis

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
NI	Nichtinduktionskontrolle	Se	Selen
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure	Sec	Selenocystein
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>	SECIS	<i>Sec insertion sequence</i>
Nsep1	<i>nuclease sensitive element binding protein 1</i>	Secisbp2	<i>SECIS binding protein 2 (Sbp2)</i>
		SECp43	<i>tRNA selenocysteine associated protein of 43 kDa</i>
NTerm	N-Terminus	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
OD	Optische Dichte	SeMet	Selenomethionin
p	Piko	SeP	Selenoprotein
³² P	³² Phosphor	Sephs	Selenophosphat-Synthetase 2 (Sps2)
PBS (-T/-B)	<i>phosphate buffered saline</i>	Sepsecs	Selenocystein-Synthase (Secs, SLA)
PCR	Polymerasekettenreaktion	Ser	Serin (Seryl-)
Prot.K	Proteinase K	Serrs	Seryl-tRNA-Synthetase
Pstk	Phosphoseryl-tRNA-Kinase	s.o.	siehe oben
PTU	Propylthiouracil	T ₂	Dijodthyronin
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>	T ₃	3,3',5'-Trijodthyronin
RBD	<i>RNA-binding domain</i>	¹ ₄	3,3',5,5'-Tetraiodthyronin, Thyroxin
rek.	rekombinant	Tab.	Tabelle
REMSA	<i>RNA electrophoretic mobility shift assay</i>	Tkv	Transkriptvariante
Rev	<i>reverse</i>	TRFA	Total-Reflexions-Röntgenfluoreszenz-Analytik
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation-Assay</i>	Trit1	tRNA-N ⁶ -Isopentenyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure	tRNA	<i>transfer RNA</i>
RNMTL1	<i>RNA methyltransferase like protein1</i>	tRNA ^{Sec}	Sec-tRNA ^{[Ser]Sec}
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>	Trsp	Sec-tRNA ^{[Ser]Sec} -Gen
ROH	Alkohole	TXNRD	Thioredoxinreduktase
rpm	Runden pro Minute	Tyr	Tyrosin
RRM	<i>RNA recognition motif</i>	U	Unit
rRNA	ribosomale RNA	UTR	untranslatierte Region
RT	Raumtemperatur	V	Volt
rT3	reverses 3,3',5' -Trijodthyronin	v/v	Volumen pro Volumen
s	Sekunde	W	Waschprobe
SAP	<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase	WB	Western Blot
Sbp2L	<i>Sbp2(Secisbp2)-like</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
SD	Standardabweichung	Wt	Wildtyp

Die Nomenklatur von Genen und Proteinen entspricht weitestgehend den aktuellen offiziellen Vorgaben z.B. von NCBI. Gene und Transkripte werden somit kursiv geschrieben. Humane Gene und Proteine werden dabei zudem in Großbuchstaben dargestellt.

Beispiele:	(Gen, Maus) <i>Rnmtl1</i>	(Protein, Maus) Rnmtl1
	(Gen, Human) <i>RNMTL1</i>	(Protein, Human) RNMTL1
	(Gen, Maus) <i>Sepp</i>	(Protein, Maus) Sepp
	(Gen, Human) <i>SePP</i>	(Protein, Human) SePP

Eine Ausnahme ist das SECp43, weil die systematische Abkürzung Trnau1ap sich in der Fachliteratur bisher nicht durchgesetzt hat.

Beispiel:	(Gen, Maus, Human) <i>Secp43</i>	(Protein, Maus, Human) SECp43
-----------	----------------------------------	-------------------------------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Strukturformeln von Cystein und Selenocystein.	1
Abbildung 1-2: Das Selen im Wandel der Zeit.	3
Abbildung 1-3: Synthese von Sec und die Selenoproteinbiosynthese der Eukaryonten und Archaeen.	8
Abbildung 1-4: Schematische Struktur von SECp43 und Alignment der hochkonservierten Tyr-reichen Region.	11
Abbildung 1-5: Eukaryontische bzw- archaische tRNA ^{Sec} -Struktur mit Modifikationen und Strukturformeln der Wobble-Uridin-Isoformen.	13
Abbildung 1-6: Schematische Struktur von humanem RNMTL1-Protein.	15
Abbildung 2-1: Aufbau und Funktionsweise des Picofox S2 Spektrometer.	52
Abbildung 3-1: Leberspezifische Inaktivierung von Secp43 in Mäusen.	59
Abbildung 3-2: mRNA-Spiegel von Selenoproteinen in der Mausleber.	61
Abbildung 3-3: Selenoproteinexpression in der Leber der <i>Alb-Cre</i> , <i>Secp43^{fl/fl}</i> - und Kontrollmäuse.	62
Abbildung 3-4: Sepp- und Se-Spiegel im Mausserum.	63
Abbildung 3-5: Selenoprotein-Aktivitäten in der Mausleber.	64
Abbildung 3-6: mRNA-Spiegel der Selenoproteinbiosynthesefaktor in der Mausleber.	65
Abbildung 3-7: Aufreinigung von rekombinantem SECp43 mittels Ni-NTA- Affinitätschromatographie.	67
Abbildung 3-8: Western Blot-Analyse der <i>in vitro</i> Translation von SECp43.	68
Abbildung 3-9: Trit1 interagiert mit tRNA ^{Sec} ermittelt im REMSA.	70
Abbildung 3-10: Bindungsanalyse von rekombinanten SECp43 mit tRNA ^{Sec} mittels REMSA.	71
Abbildung 3-11: Interaktion von titriertem <i>in vitro</i> translatierten SECp43 mit tRNA ^{Sec}	72
Abbildung 3-12: Interaktion von SECp43 mit eigener mRNA getestet im REMSA. ..	74
Abbildung 3-13: Schematische Übersicht der klonierten RNMTL1-Konstrukte.	76
Abbildung 3-14: Western Blot-Analyse und Dejodase-Aktivitätsassay nach Transduktion der RNMTL1-Konstrukte in HepG2-Zellen.	77
Abbildung 3-15: Western Blot-Analyse der mit den RNMTL1-Konstrukten transient transfizierten HepG2-Zellen.	78

Abbildung 3-16: Dejodase-Aktivitätsassay von Proteinproben der mit RNMTL1-Konstrukten stabil transfizierten HepG2-Zellklone.....	80
Abbildung 3-17: Analyse der Selenoproteinexpression der mit RNMTL1-Konstrukten stabil transfizierten HepG2-Zellklone.....	81
Abbildung 3-18: Aufreinigung von rekombinanter RNMTL1 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	84
Abbildung 3-19: Bindungsanalyse von RNMTL1 mit der tRNA ^{Sec}	85
Abbildung 3-20: Western Blot-Analyse der RNMTL1-Lokalisation nach Mitochondrien-isolation aus HepG2-Zellen.	85
Abbildung 3-21: Radioaktive Importassays von RNMTL1-Wt und der Mutante Del-MTS in Mitochondrien von HeLa-Zellen, analysiert mittels SDS-PAGE und Phosphorimaging.	86
Abbildung 6-1: Western Blot-Analysen der einzelnen Selenoproteine in der Leber der <i>Alb-Cre</i> , <i>Secp43^{fl/fl}</i> - und Kontrollmäuse mit Quantifizierungen.	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Katalog der 25 humanen Selenoproteine mit deren Vorkommen und Funktion ¹	5
Tabelle 2-1: verwendete Geräte	18
Tabelle 2-2: verwendete Reagenzsysteme.....	20
Tabelle 2-3: Verwendete Software.	20
Tabelle 2-4: Verwendete Datenbanken	21
Tabelle 2-5: Verwendete Vektoren	21
Tabelle 2-6: verwendete Antikörper für Western Blot	21
Tabelle 2-7: verwendete Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	22
Tabelle 2-8: Genotypisierungs-PCRs <i>Alb-Cre</i> und <i>Secp43^{fl/fl}</i>	24
Tabelle 2-9: verwendete Primer für die qRT-PCR	25
Tabelle 2-10: Klonierungs-PCR mit KAPA HiFi PCR Kit.....	26
Tabelle 2-11: Puffer der DNA-Gelelektrophorese und der Bakterienkultivierung.....	27
Tabelle 2-12: Primersequenzen für Klonierung von <i>RNMTL1</i> -Konstrukten in lentiviralen pCDH	29
Tabelle 2-13: Primersequenzen für Klonierung von <i>RNMTL1</i> -Konstrukten in pcDNA3.1/V5-His-TOPO	30
Tabelle 2-14: Primersequenzen für Klonierungen in den Expressionsvektor pET52b(+)	31
Tabelle 2-15: Transkriptionsansatz.....	32
Tabelle 2-16: Reaktionsansatz der <i>in vitro</i> Translation	33
Tabelle 2-17: Puffer-, Gelzusammensetzung und Reaktionsansätze für den REMSA.....	34
Tabelle 2-18: Zusammensetzung des Mitochondrienisolationspuffer	35
Tabelle 2-19: verwendete Lösungen und Puffer	36
Tabelle 2-20: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels und Proteinmengen	40
Tabelle 2-21: Proteinmenge und rT3-Konzentration.....	42
Tabelle 2-22: Substratmixzusammensetzung.....	43
Tabelle 2-23: Puffer und Lösungen für den Dejodase-Assay	43
Tabelle 2-24: Reaktionsmix und Versuchsansätze	45
Tabelle 2-25: Zusammensetzung des Reaktionsmix	46
Tabelle 2-26: Puffer für die Messung von ASAT und ALAT	47

Tabelle 2-27: Puffer und Lösungen für Proteinexpression und -aufreinigung	51
Tabelle 2-28: Zusammensetzung der Zellkulturmedien	57
Tabelle 3-1: Aktivitäten der Leber-Transaminasen im Mausserum.....	60

Zusammenfassung

Selenoproteine enthalten die 21. proteinogene Aminosäure Selenocystein (Sec), welche über einen kotranslationalen Mechanismus in Proteine inkorporiert wird. Dieser beinhaltet eine Rekodierung des „Stopp“-Codons UGA in ein Sec-Codon unter Anleitung und Interaktion einer Vielzahl Sec-spezifischer *cis*- und *trans*-agierender Faktoren. Einige dieser Faktoren bzw. deren Funktionen sind bis dato noch unbekannt.

Einer dieser Faktoren ist SECp43, von dem man annimmt, dass es als Kofaktor bei der Selenoproteinbiosynthese wirkt. So wurde zufällig eine Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vivo* entdeckt. Später wurde eine Interaktion von SECp43 mit einem 48 kDa großen Protein, möglicherweise Selenocysteinsynthase, gefunden. Weitere Experimente zeigten eine Reduktion der 2'-O-methylierten Sec-tRNA^{[Ser]Sec}-Isoform mcm⁵U sowie eine Reduktion der Expression bestimmter Selenoproteine durch *Secp43-knockdown* in NIH3T3-Zellen. Aufgrund dieser Befunde haben wir die Rolle von SECp43 innerhalb der Selenoproteinbiosynthese *in vivo* beim Mausmodell untersucht, sowie die Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vitro* erneut getestet.

Von unserem Kooperationspartner Dr. Dolph Hatfield an den National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA) wurden zwei *Secp43* Mausmutanten generiert. In einer Mutante wurden Exon 3 und 4, inklusive des ersten *RNA recognition motif*, von *Secp43* konstitutiv *in frame* deletiert, ohne einen Effekt auf die Selenoproteinexpression und die embryonale Entwicklung zu zeigen. Die zweite Mutante mit einer konstitutiven *out of frame*-Deletion der Exons 7 und 8, welche die Tyrosin-reiche Region eliminierte, war hingegen embryonal letal. Darum wurde eine weiterführende konditionale Inaktivierung von *Secp43*^{Δ7+8} in der Leber durchgeführt, um dort die hepatische Selenoproteinexpression zu analysieren. Die generierten *Alb-Cre*; *Secp43*^{fl/fl}-Mäuse offenbarten jedoch keine veränderte Selenoproteinexpression. Die Western Blot-Analysen der Selenoproteine, die Aktivitätsmessungen der Selenoenzyme, die Plasmaselenwerte als Marker für die hepatische Sepp-Produktion sowie die Western Blot-Analyse von Sepp im Plasma und auch die mRNA-Spiegel einiger Selenoproteine zeigten normale Werte. Zudem waren die mRNA-Spiegel bestimmter Selenoproteinbiosynthesefaktoren, deren Hochregulierung als Indikator für Veränderungen in der Selenoproteinbiosynthese dienen könnte, ebenfalls normal.

Zusätzliche ^{75}Se -Markierungsexperimente am NIH ließen ebenfalls keine veränderte Selenoproteinbiosynthese erkennen. Weiterhin demonstrierten unsere Interaktionsstudien eine Bindung von SECp43 mit der Sec-tRNA^{[Ser]Sec} *in vitro*, welche aber noch verifiziert werden müssen.

Die deletierten Domänen von SECp43 scheinen nicht essentiell für die Selenoproteinexpression der Hepatozyten zu sein. Deshalb haben wir durch konditionale Inaktivierung von *Secp43*^{Δ7+8} in Neuronen überprüft, ob SECp43 in anderen Zellen essentiell ist. Während keine Veränderung der Selenoproteinexpression im Gehirn gefunden wurde, konnte ein leichter Bewegungsphänotyp bei den Mutanten beobachtet werden, auch wenn die Tiere ansonsten gesund erschienen.

Ein weiterer bisher unbekannter Faktor der Selenoproteinbiosynthese ist die 2'-O-Methyltransferase der Sec-tRNA^{[Ser]Sec}-Isoform mcm⁵Um. Die Präsenz dieser Isoform scheint mit der Expression stressbezogener Selenoproteine zu korrelieren. Anlässlich früherer Experimente der Arbeitsgruppe, in denen RNMTL1-überexprimierende HepG2-Zellen eine Aktivitätsinduktion des Selenoproteins DIO1 dokumentierten, galt die RNMTL1 als ein Kandidat. Darum wurde der Einfluss von RNMTL1 sowie von RNMTL1-Deletionsmutanten auf die Expression von Selenoproteinen in HepG2-Zellen, insbesondere der Dejodase 1 (DIO1), untersucht, sowie deren Interaktion mit der Sec-tRNA^{[Ser]Sec} *in vitro* getestet. Zudem wurde ein RNMTL1-Transport in die Mitochondrien angenommen, der analysiert wurde.

Der Dejodase-Aktivitätsassay und die Western Blot-Analysen einiger Selenoproteine konnten keinen Effekt der Überexpression von RNMTL1 oder deren Deletionmutanten auf die Selenproteinexpression in HepG2-Zellen zeigen, ausgenommen der Mutante mit deletierter L7Ae-Domäne aus nicht eindeutigen Gründen. Es konnte außerdem keine eindeutige Interaktion von RNMTL1 mit der Sec-tRNA^{[Ser]Sec} *in vitro* festgestellt werden. Eine Western Blot-Analyse nach einer Mitochondrienisolation aus HepG2-Zellen sowie Importassays aus der AG Voos konnten einen Transport ins Mitochondrium bestätigen. Kurz nach Abschluss dieser Experimente wurde die RNMTL1 als die 2'-O-Methyltransferase der Ribose von G¹³⁷⁰ des 16S-rRNA-Kerns der humanen großen mitochondrialen Ribosomenuntereinheit identifiziert. Dadurch, zuzüglich der Ergebnisse dieser Arbeit, kann die RNMTL1 als Kandidat der 2'-O-Methyltransferase der Sec-tRNA^{[Ser]Sec}-Isoform mcm⁵Um zunächst verworfen werden.

1. Einleitung

1.1. Selen

1.1.1. Vom Toxin zum essentiellen Spurenelement

Der schwedische Chemiker Jöns Jakob Berzelius (1779 - 1848) identifizierte 1817 ein neues Element, dem er den Namen Selen (Se) gab. Se ist ein Metalloid, das durch Zufall bei der Produktion von Schwefelsäure entdeckt wurde. Aufgrund der silbrigen Erscheinung benannte Berzelius das neu entdeckte Element nach der griechischen Mondgöttin "*Selene*" (Arner 2010). Im Jahr 1818 publizierte Berzelius seine Entdeckung und verwies zudem auf die große Ähnlichkeit zwischen Selen und Schwefel (S). Diese Ähnlichkeit stellte später sicherlich eine Verbindung zu den damals noch unbekannten Selenocystein (Sec)- bzw. den Cystein (Cys)- enthaltenen Proteinen her (Abb. 1-1), in denen die beiden Elemente jeweils analoge Eigenschaften einnehmen und noch heute im Fokus der Forschung stehen (Arner 2010).

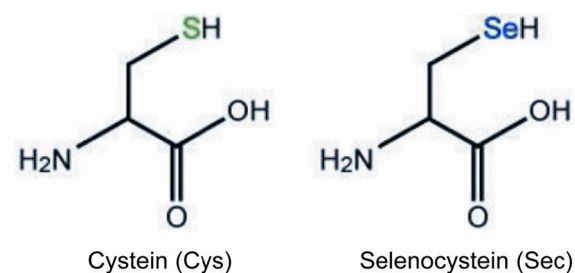


Abbildung 1-1: Strukturformeln von Cystein und Selenocystein. Grünes S = Schwefel; Blaues Se = Selen (www.sciencedaily.com/releases/2010/08/100812171939.htm).

Se besitzt die Ordnungszahl 34 und gehört neben den ähnlich gebauten Schwefel und Tellur zu der VI. Hauptgruppe des Periodensystems, den Chalkogenen.

Bis Mitte des 20. Jahrhunderts wurde dem Se eine toxische (Rosenfeld und Beath 1945) sowie auch eine karzinogene Wirkung (Nelson *et al.* 1943) zugesprochen. Im Jahre 1961 wurde in der chinesischen Provinz Hubei eine endemische Krankheit entdeckt, der bis 1964 fast 50 % der Bewohner in den entsprechenden Regionen zum Opfer fielen. Sie wurde auf eine Selenintoxikation (Selenose) nach verstärktem

Verzehr von selenhaltigem Essen zurückgeführt (Yang *et al.* 1983). Beim Menschen äußert sich eine Selenose in Form von Haarausfall, dystrophischer Änderung der Fingernägel, gastrointestinalen Symptomen sowie Gedächtnisproblemen (Aldosary *et al.* 2012; Sutter *et al.* 2008).

Im Wandel der Zeit manifestierte sich das Se jedoch von einer toxischen karzinogenen Substanz als ein essentielles Spurenelement (Abb. 1-2). Basierend auf der Erforschung von Se als Bestandteil des sogenannten Faktor 3, der eine positive hemmende Wirkung auf die Vitamin E-Mangel-induzierte Degeneration der Leber am Rattenmodell zeigte, konnte die Relevanz von Se in Säugetieren demonstriert werden (Schwarz 1951; Schwarz und Foltz 1999). Im Jahre 1973 wurde Se als Bestandteil der bakteriellen Glycinreduktase und der Gluthationperoxidase (GPX) dokumentiert, aus der auch die Definition Selenoprotein entstand. Selenoproteine beschreiben Proteine mit Se in seiner Primärstruktur (Flohe *et al.* 1973; Rotruck *et al.* 1973; Turner und Stadtman 1973). Drei Jahre später konnte in der Glycinreduktase erstmals Selenocystein (Sec) als der Se-Träger identifiziert werden (Cone *et al.* 1976).

Entgegen der früheren Annahme der karzinogenen Wirkung wurde Se eine potenzielle Rolle in der Prävention von Tumorerkrankungen zugesprochen (Diwadkar-Navsariwala und Diamond 2004; Vinceti *et al.* 2014). Es gibt signifikante Hinweise, nach denen ein erniedrigter Se-Spiegel mit erhöhtem Krebsrisiko assoziiert ist (Lener *et al.* 2015).

Auch in anderen Krankheiten konnte ein enges Verhältnis zwischen Se-Status und Krankheitsverlauf gezeigt werden. Zum Beispiel weisen Patienten mit schwerer Sepsis einen niedrigen Plasmaselenspiegel auf. Durch Se-Supplementation in Form von Natriumselenit konnte die Sterberate der Patienten verringert werden (Angstwurm *et al.* 2007). Zudem existieren weitere mit dem Se-Mangel verknüpfte Krankheiten, zum Beispiel die in China auftretende Keshan-Krankheit (endemische Myokarditis), die Kashin Beck Erkrankung (destruktive Osteoarthritis) und den myxödematösen Kretinismus (Schilddrüsenhormonmangel) (Flohe 2009; Vanderpas *et al.* 1990; Yang 1983; Yang *et al.* 1988; Zou *et al.* 2009). Nach diesen Erkenntnissen gewinnt die Supplementation von Se in der Medizin immer mehr an Bedeutung. Es ist mittlerweile keine Hypothese mehr, dass das Se in der richtigen Dosis viele wichtige Funktionen und einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Menschen hat (Rayman 2012).

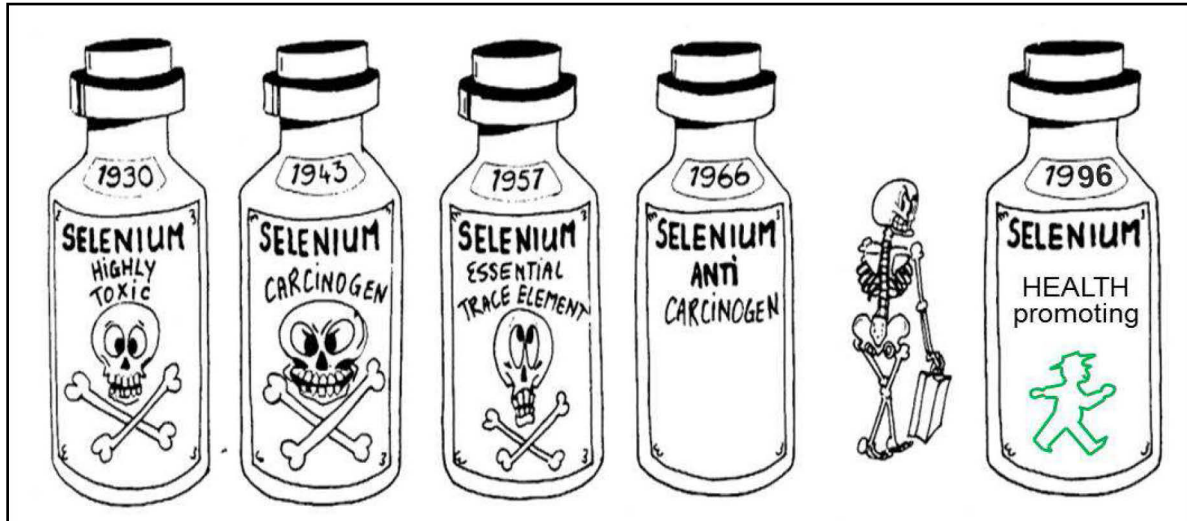


Abbildung 1-2: Das Selen im Wandel der Zeit. Im Laufe des letzten Jahrhunderts entwickelte sich das Selen von einer toxischen karzinogenen Substanz zu einem essentiellen Spurenelement. Später wurde dem Selen sogar eine antikarzinogene Wirkung sowie gesundheitsfördernde Eigenschaften attestiert (modifiziert nach Vernie (Vernie 1984) und Köhrle (Köhrle 1999)).

1.1.2. Aufnahme und Metabolismus von Selen

Se wird vom Körper zum Teil in anorganischer Form als Selenat- und Selenitsalze, hauptsächlich jedoch in organischer Form, als Aminosäure (AS) L-Selenomethionin (SeMet), über die pflanzliche Nahrung (z.B. durch Getreide) aufgenommen. Vom Säuger wird das SeMet anstatt der AS Methionin über den SeMet-Zyklus in SeMet-haltige Proteine unspezifisch eingebaut (Burk *et al.* 2001). Eine weitere organische Se-Verbindung in Form der AS Selenocystein (Sec) liefern tierische Nahrungsmittel. Diese wird jedoch im Gegensatz zu SeMet spezifisch über einen bestimmten Mechanismus in die Selenoproteine eingebaut, auf den im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird. Durch Transselenierung wird SeMet zu Sec transformiert werden. Überschüssiges Selen wird dann neben dem anorganischen Selenat und Selenit zu toxischem Selenwasserstoff H_2Se reduziert. Das H_2Se wird über 2 bis 3 Methylierungsschritte detoxifiziert und als Dimethylselenid und Trimethylselenonium-Ion über den Urin oder die Atemluft vom Körper ausgeschieden. Zudem wird überschüssiges Se auch in Form von Selenozuckern über den Urin exkretiert (Hoefig *et al.* 2011). Alternativ kann das Selen des H_2Se in der Leber innerhalb des Selenoprotein-Zyklus in Selenoproteine eingebaut werden, worauf in Abschnitt 1.2.2 eingegangen wird

1.2. Selenoproteine, ihre Biosynthese und Faktoren

1.2.1. Überblick über die Selenoproteine und deren Funktionen

Selenoproteine enthalten die 21. proteinogene Aminosäure Selenocystein (Sec). Der gezielte Einbau von Selenocystein wird über den genetischen Code bestimmt (Böck *et al.* 1991; Hatfield und Diamond 1993; Hatfield und Gladyshev 2002). Dabei ist eine Umkodierung des eigentlichen Stoppcodons UGA erforderlich, sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryonten. Innerhalb dieser unterscheiden sich jedoch die Details (Hatfield *et al.* 2006; Stock und Rother 2009). Selenoproteine kommen in allen drei Domänen des Lebens vor: den Bakterien, Archaeen und Eukaryonten. Nur Landpflanzen und Pilze (u.a. Hefen) kommen ohne Selenoproteine aus. Mehr als 100 Selenoproteine in über 50 Selenoproteinfamilien sind bisher bekannt (Mariotti *et al.* 2013; Novoselov *et al.* 2002; Papp *et al.* 2007; Romagne *et al.* 2014). Dabei variiert die Anzahl der Selenoproteine zwischen den verschiedenen Organismen. Das Selenoproteom des Menschen besteht z.B. aus 25 Selenoproteinen, das der Nager aus 24 (Kryukov *et al.* 2003). Das aktuell größte Selenoproteom mit entsprechend 59 Selenoproteingenen wurde in der Alge *Aureococcus anophagefferens* entdeckt (Gobler *et al.* 2013). Tabelle 1-1 zeigt eine Übersicht aller aktuell bekannten humanen Selenoproteine sowie deren Funktion.

Zu den am besten charakterisierten Vertretern der Selenoproteine gehören die Glutathion-Peroxidasen (GPX) und Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD), die alle als Antioxidantien dienen, sowie die Jodthyronindejodasen (DIO), welche im Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel involviert sind. Die bedeutendste Aufgabe dieser ist u.a. die Konvertierung von inaktivem 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin (Thyroxin oder T₄) in das aktive Hormon 3,3',5-Trijod-L-thyronin (T₃). Des Weiteren ist auch die Bedeutung von Selenoprotein P (SePP) zu erwähnen, das den Hauptselentransporter im Plasma darstellt und hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber exprimiert wird (Schweizer *et al.* 2005). Es ist das einzige Selenoprotein, dessen Transkript 10 Sec-Codons beinhaltet. Zudem ist es das dominante sowie zweite Plasma-Selenoprotein neben GPX3 und umfasst im gesunden Individuum ca. 50 % des Se im Plasma (Burk und Hill 2005).

Tabelle 1-1: Katalog der 25 humanen Selenoproteine mit deren Vorkommen und Funktion¹

Selenoprotein	Vorkommen (Abk. ²)	Funktion
Glutathionperoxidasen (GPX)		
Cytosolische GPX (GPX1)	ubiquitär (Cyt)	Antioxidantien (Detoxifikation von Hydroperoxiden) sowie Strukturproteine in Spermien (GPX4)
Gastrointestinale GPX (GPX2)	gastrointestinal (Cyt)	
Plasma GPX (GPX3)	Plasma, Niere	
Phospholipidhydroperoxid GPX (GPX4)	Ubiquitär (Cyt, Mito)	
Glutathionperoxidase 6	Riechepithel (Cyt)	
Iodothyronindejodasen		
5'-Dejodase Typ 1 (DIO1)	Schilddrüse, Leber, Niere (Plasma-membran)	Aktivierung von Thyroxin (T4) zu bioaktivem 3,3',5-Trijod-L-thyronin (T3), Katalyse des Abbaus von T4 und T3 zu 3,3',5' reversem T3 (rT3)
5'-Dejodase Typ 2 (DIO2)	Gehirn (ER)	Konvertierung von Thyroxin (T4) zu bioaktivem 3,3',5-Trijod-L-thyronin (T3)
5-Dejodase Typ 3 (DIO3)	Gehirn, Plazenta (Plasmamembran)	Konvertierung von Thyroxin (T4) zu inaktivem 3,3',5' rT3 und T3 zu 3,3'-Dijod-L-thyronin (T2)
Thioredoxin Reduktasen (TXNRD)		
Cytoplasmatische/Nukleäre TXNRD (TXNRD1)	ubiquitär (Cyt)	Reduktion von Thioredoxin , Entgiftung von Peroxiden
Mitochondriale TXNRD (TXNRD2)	weit verbreitet (Mito)	
Testikuläre TXNRD (TXNRD3)	Hoden (Cyt)	
Weitere Selenoproteine		
Selenophosphat-Synthetase 2 (SephS2)	weit verbreitet (Cyt)	Synthese von Selenophosphat
Selenoprotein H (SePH)	weit verbreitet (Nuk)	Antioxidans
Selenoprotein K (SePK)	Herz, Milz, Hoden (ER-Membran)	Glykoproteinfaltung, ER-Stress
Selenoprotein P (SePP)	Leber, Plasma	Speicherung und Transport von Se
Selenoprotein R (SePR, MsrB)	Leber, Niere (Cyt)	Reduktion von Methionin-R-sulfoxid
Selenoprotein S (SePS)	weit verbreitet (ER-Membran)	Proteindegradation, ER-Stress, intrazellulärer Membrantransport
Weitere Selenoproteine mit hypothetischen Funktionen		mögliche Funktionen
15 kDa Selenoprotein (Sep15)	u.a. Leber, Niere(ER)	Proteinfaltung, Redox-Funktion
Selenoprotein I (SePI)	weit verbreitet (Mem)	Phospholipidsynthese
Selenoprotein M (SePM)	Gehirn (ER)	Antioxidans, Ca ²⁺ -Regulation
Selenoprotein N (SePN)	v.a. Skelettmuskel (ER-Membran)	Antioxidans, Ca ²⁺ -Regulation
Selenoprotein O (SePO)	unbekannt	unbekannt
Selenoprotein T (SePT)	weit verbreitet (ER, Golgi)	Redox-Regulation, Zelladhäsion, Ca ²⁺ -Regulation
Selenoprotein V (SePV)	Hoden (Cyt.)	Redox-Funktion Spermatogenese
Selenoprotein W (SePW)	v.a. Skelettmuskel, Herz (Cyt)	Antioxidans

¹Diese Tabelle ist modifiziert nach (Kasaikina *et al.* 2012; Moustafa und Antar 2012; Papp *et al.* 2007; Park *et al.* 2012; Reeves *et al.* 2010; Reeves und Hoffmann 2009; Tanguy *et al.* 2012; Turanov *et al.* 2014; Varlamova und Novoselov 2012; Whanger 2009).

²Cyt.= Cytosol, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Mem = Membran, Mito.= Mitochondrium, Nuk = Nukleus.

Ein weiteres besonderes Selenoprotein stellt die Selenophosphat Synthetase 2 (Seps2, Sps2) dar, welche selbst direkt ein wichtiger Bestandteil der Selenoproteinbiosynthese ist (Guimaraes *et al.* 1996). Es wandelt unter ATP-

Verbrauch das Selenid in Form HSe^- zu Selenophosphat ($\text{H}_2\text{SePO}_3^-$) um (siehe 1.2.2).

1.2.2. Selenocystein- und Selenoproteinbiosynthese

Der Einbau von Sec und damit der kotranslationale Einbau von Se in die Polypeptidkette eines Selenoproteins erfolgt über einen ganz speziellen Mechanismus (Abb. 1-3) (Zinoni *et al.* 1986), der immer noch viele Fragen mit sich bringt und stets im Fokus der Forschung steht (Allmang *et al.* 2009). Sec wird mithilfe mehrerer Enzyme auf seiner eigenen tRNA synthetisiert, die als $\text{Sec-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ bezeichnet wird und mit 90 Nukleotiden im Gegensatz zu den kanonischen tRNA-Molekülen die längste eukaryontische tRNA darstellt (Lee *et al.* 1989; Xu *et al.* 2007). Zudem finden einige post-transkriptionale Modifikationen an der tRNA^{Sec} statt, die essentiell für die Translation und somit für die Selenoproteinexpression sind (Abschnitt 1.2.4). Sec wird nur dann synthetisiert, wenn es gerade für die Selenoproteinbiosynthese gebraucht wird (Seeher *et al.* 2012). Eine schematische Darstellung der Sec-Biosynthese in Eukaryoten und Archaeen ist in Abbildung 1-3 A dargestellt, die aus mehreren Schritten besteht:

Zunächst wird die freie tRNA, katalysiert durch die Seryl-tRNA-Synthetase (SerrS), mit einem Seryl-Rest aminoacetyliert (Lee *et al.* 1989). Dieser wird über die Phosphoseryl-tRNA-Kinase (Pstk) phosphoryliert, wodurch die $\text{Seryl-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ aktiviert wird (Carlson *et al.* 2004). Gleichzeitig erfolgt die Reduktion von in der Zelle freigesetztem Selen zu Selenid in Form von HSe^- . Dieses wird unter ATP-Verbrauch von der Se-abhängigen SepS2 (Guimaraes *et al.* 1996) zu Selenophosphat (SePO_3^-) transformiert. Anschließend wird durch die Selenocystein-Synthase (SecS, SepSecS, SLA) die Umwandlung von $\text{PSer-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ mit Selenophosphat zu $\text{Sec-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ (tRNA^{Sec}) katalysiert. Nach diesem Schritt ist die geladene tRNA^{Sec} für die Selenoproteinbiosynthese komplett ausgebildet (Xu *et al.* 2007).

Der Einbau von Sec in ein Selenoprotein erfordert eine Rekodierung des natürlichen Stopp-Codons UGA in ein Sec-Codon unter Anleitung und Interaktion einer Vielzahl von Sec-spezifischer *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren (Abb. 1-3 B) (Mullenbach *et al.* 1988; Seeher *et al.* 2012; Zinoni *et al.* 1986). Bedeutend darunter ist das Sec *insertion sequence* (SECIS)-Element, lokalisiert in der 3'-untranslatierten Region

(UTR) auf der Selenoprotein-mRNA (Berry *et al.* 1991). Dieses liegt dort in Form einer Haarnadelstruktur vor. Bei Eukaryonten wird zwischen zwei bekannten SECIS-Element-Formen unterschieden. Form 1 bildet eine klassische Haarnadelschleife (z.B. mRNA von GPX1 und DIO1), während Form 2 apikal eine zusätzliche Schleife bildet (z.B. mRNA von DIO2, GPX4 und TXRND). Form 2 ist insgesamt am meisten verbreitet. (Fagegaltier, Lescure, *et al.* 2000; Grundner-Culemann *et al.* 1999; Walczak *et al.* 1996). Als eine Besonderheit dabei zählt das SePP, das beide Formen besitzt, vermutlich aufgrund seiner vielen Sec-Codons (Stoytcheva *et al.* 2006). Beide SECIS-Element-Formen besitzen zwei Helices, die durch eine interne Schleife voneinander getrennt sind (Walczak *et al.* 1996). Helix 2 beinhaltet den am meisten konservierten Abschnitt des SECIS-Elements in Form eines Quartetts von Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren, die das SECIS-core bilden (Martin *et al.* 1998; Walczak *et al.* 1998). Diese Konsensus-Sequenz formt eine *kink-turn*-Struktur, die essentiell für die Vermittlung der Translation ist (Seeher *et al.* 2012). Es stellt eine scharfe Windung in der Sekundärstruktur der RNA dar, die aufgrund eines Knicks in dem Phosphodiester-Rückgrat erfolgt. Ursprünglich wurde das *kink-turn*-Motiv nur in ribosomalen und spleißosomalen RNAs beobachtet (Vidovic *et al.* 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor ist das *SECIS binding protein 2* (Secisbp2, Sbp2). Das Sbp2 besitzt ein L7Ae-RNA-Bindemotiv, auf das in Abschnitt 1.2.5 weiter eingegangen wird. Über dieses Motiv erkennt das Sbp2 das SECIS-Element, bindet an dessen *kink-turn*-Motiv und interagiert mit dem Ribosom (Copeland *et al.* 2000; Fletcher *et al.* 2001; Low *et al.* 2000; Kinzy *et al.* 2005). Über den *Sec-specific elongation factor* (EFSec) wird die beladene tRNA^{Sec} zum Ribosom dirigiert. Dort formt es einen Komplex mit dem am SECIS-Element gebundenen Sbp2 (Donovan *et al.* 2008; Fagegaltier, Hubert, *et al.* 2000; Tujebajeva *et al.* 2000).

Es existieren weitere Faktoren, die eine Rolle beim Sec-Einbau in der Selenoproteinbiosynthese spielen. Die genauen Funktionen und deren Bedeutung werden aktuell erforscht. Das ribosomale Protein L30 zum Beispiel ist ebenfalls ein SECIS-bindendes Protein, das vermutlich mit dem Sbp2 um die SECIS-Bindungsstelle kompetiert. Eine Theorie ist, das Sbp2 anfangs zur Rekrutierung von EFSec und tRNA^{Sec} an das SECIS-Element bindet, um danach vom L30 zur Fixierung und Positionierung am Ribosomen substituiert zu werden (Chavatte *et al.* 2005).

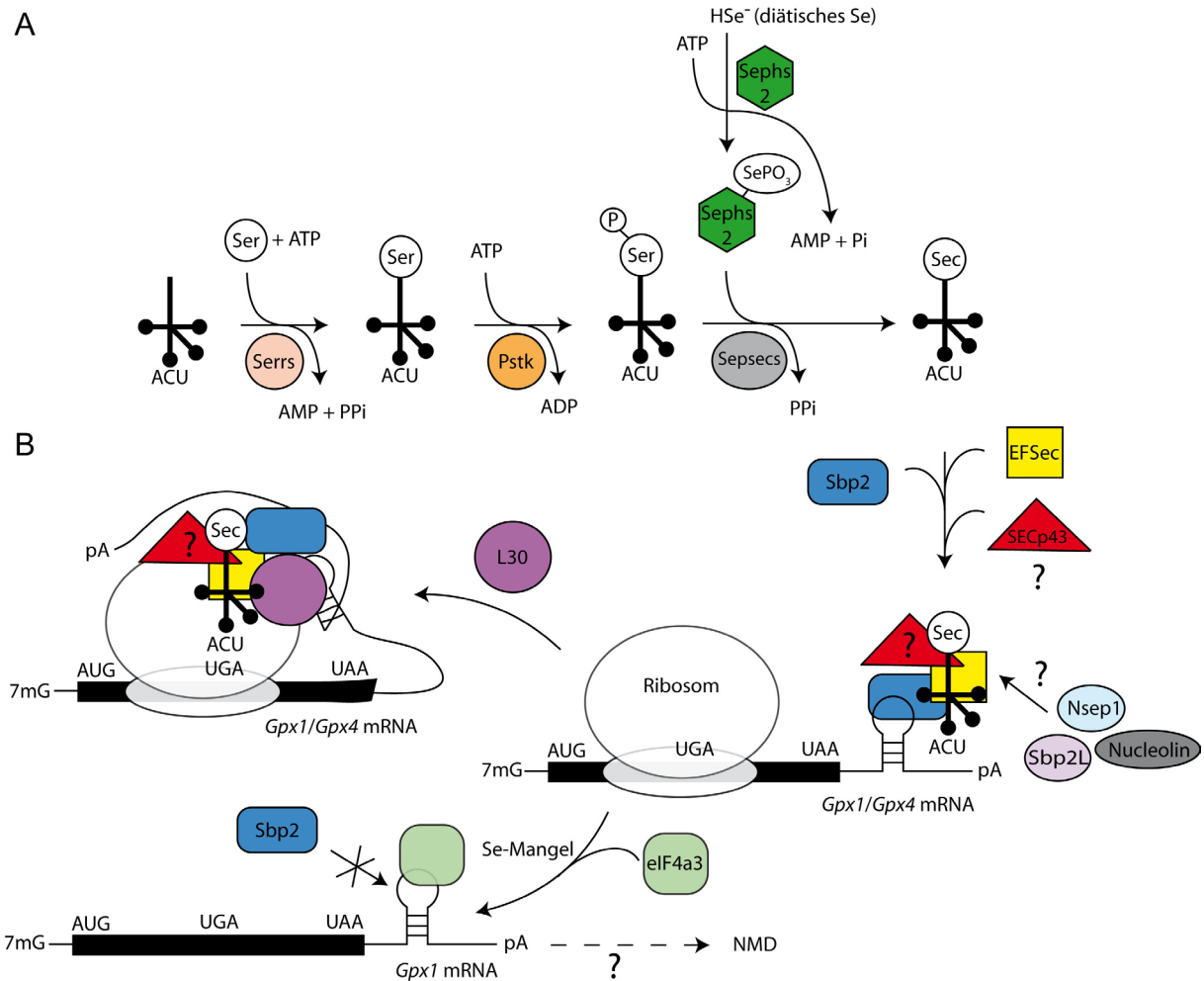


Abbildung 1-3: Synthese von Sec und die Selenoproteinbiosynthese der Eukaryonten und Archaeen. (A) Die Synthese von Sec auf seiner eigenen tRNA. Zunächst wird die zuständige tRNA mit einem Seryl-Rest mithilfe der Seryl-tRNA-Synthetase (Serrs) zu Ser-tRNA^{[Ser]Sec} aminoacetyliert und diese dann über Phosphorylierung durch die Phosphoseryl-tRNA-Kinase (Pstk) aktiviert. Gleichzeitig wird diätisches Se zu Selenid in Form von HSe⁻ reduziert, um dann von der Selenophosphat-Synthetase 2 (Seph2, Sps2) unter ATP-Verbrauch zu Selenophosphat (SePO₃) umgewandelt zu werden. Zuletzt erfolgt die Umwandlung von P-Ser-tRNA^{[Ser]Sec} mit Selenophosphat zu Sec-tRNA^{[Ser]Sec} (tRNA^{Sec}) durch die Selenocystein-Synthase (Secs, Sepsecs), wonach diese vollständig ausgebildet ist. (B) Die Biosynthese von Selenoproteinen. Zur Inkorporation von Sec in die Polypeptidkette eines Selenoproteins muss das Stopp-Codon UGA zum Sec-Codon rekodiert werden, dass mithilfe mehrerer cis- und trans-agierender Faktoren erfolgt. Dabei wird das wichtige Sec insertion sequence (SECIS)-Element von dem essentiellen SECIS binding protein 2 (Secisbp2, Sbp2) über dessen Haarnadelstruktur gebunden, um anschließend mit dem Sec-specific elongation factor (EFSec) zu interagieren, der die zuvor gebundene beladene tRNA^{Sec} zum Ribosomen dirigiert. Diese Interaktion und die Wechselwirkung mit dem ribosomalen L30-Protein lassen die mRNA in der 3'UTR-Region mit dem gebundenen SECIS-Element sich zum Ribosomen hin krümmen und das Sec wird eingebaut. Den weiteren Faktoren tRNA selenocysteine associated protein of 43 kDa (Trna1ap, SECp43), Nucleolin, nuclease sensitive element binding protein 1 (Nsep1) und Sbp2-like (Sbp2L) werden auch eine Interaktion mit dem Komplex zugesprochen, jedoch mit bisher unbekannter

Funktion. Bei Se-Mangel kompetiert der *eukaryotic Initiation Factor 4a3* (eIF4a3) das Sbp2 an seiner Bindestelle am SECIS-Element und inhibiert somit die Synthese der nicht essentiellen Selenoproteine. Die mRNA wird in dem Fall mithilfe des *nonsense mediated decay* (NMD) abgebaut. Modifiziert nach (Seeher *et al.* 2012).

Nuceolin, eines der wichtigsten nukleolären Proteine, konnte ebenfalls eine Bindung zum SECIS-Element nachgewiesen werden. Diesem wird dadurch einen verstärkenden Effekt auf die Translation nachgesagt. Jedoch ist dessen Affinität noch unklar und wird in Abhängigkeit zur Relevanz des zu exprimierenden Selenoproteins gestellt (Miniard *et al.* 2010; Squires *et al.* 2007). Der *eukaryotic Initiation Factor 4a3* (eIF4a3) spielt eine wichtige Rolle in der translationalen Kontrolle einiger Selenoproteine. EIF4a3 kann durch Interaktion mit der entsprechenden Selenoprotein-mRNA, bevorzugt mit dem SECIS-Element Form 1, die Bindung von Sbp2 zum SECIS-Element inhibieren, wie für Gpx1 gezeigt. Die Expression von eIF4a3 wird vom Se-Status gesteuert (Budiman *et al.* 2009), da bei Se-Mangel nur essentielle Selenoproteine exprimiert werden (Schomburg und Schweizer 2009). So konnte zum Beispiel *in vivo* am Rattenmodell gezeigt werden, dass unter Se-Mangel die Expression des essentiellen Selenoproteins DIO1 im Vergleich zum allgegenwärtigen Gpx1 aufrechterhalten wurde (Behne und Kyriakopoulos 1993; Bermano *et al.* 1995). Die mRNA nicht-essentieller Selenoproteine hingegen wird durch den *nonsense mediated decay* (NMD) abgebaut, wie z.B. für Gpx1 beschrieben (Moriarty *et al.* 1998; Sun und Maquat 2002). Der NMD ist ein post-transkriptionaler Kontrollmechanismus, der die Translation aberranter mRNA verhindert. Das Erkennungssignal dafür ist ein vorzeitiges Stoppcodon, das 50 bis 55 Nukleotide vor einer Exon-Exon-Verbindung lokalisiert ist (Sun und Maquat 2002). Zwei weitere Proteine, *nuclease sensitive element binding protein 1* (Nsep1) und *Sbp2-like* (Sbp2L), werden bis heute noch auf deren potenzieller Mitwirkung in der Selenoproteinbiosynthese erforscht (Donovan und Copeland 2009; Shen *et al.* 2006). Es wird angenommen, dass ein weiteres Protein, das *tRNA selenocysteine associated protein of 43 kDa* (Trnau1ap, SECp43), einen Komplex mit Sepsecs und der tRNA^{Sec} eingeht (Xu *et al.* 2005). Diese Hypothese sowie dessen genaue Funktion werden weiterhin diskutiert. Im folgenden Abschnitt sowie als Thema dieser Arbeit wird darauf genauer eingegangen.

1.2.3. *tRNA selenocysteine associated protein of 43 kDa (SECp43)*

Das im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnte Protein *tRNA selenocysteine associated protein of 43 kDa* (Trna1ap, SECp43) ist bisher von unbekannter Funktion und daher Thema dieser Arbeit. Es scheint aufgrund mehrerer früherer Befunde an der Selenoproteinbiosynthese beteiligt zu sein. SECp43 wurde von Ding und Grabowski 1999 zum ersten Mal über einen degenerierenden PCR-Screen für RNA-bindende Proteine identifiziert. Als diese später eine Affinitätschromatographie von HeLa-Zellextrakt über eine mit SECp43-Antikörper beschichtete Säule durchführten, entdeckten sie eine, an dem aufgereinigten SECp43 gebundene RNA. Diese stellte sich nach Sequenzierung als die tRNA^{Sec} heraus (Ding und Grabowski 1999). Eine direkte Bindung von rekombinantem SECp43 mit *in vitro* transkribierter, unbeladener und unmodifizierter tRNA^{Sec} hingegen konnte nicht nachgewiesen werden (Small-Howard *et al.* 2006). Später konnte nach einem *knockdown* von SECp43 in NIH3T3- sowie in TCMK-1-Zellen mittels RNA-Interferenz eine Reduktion der 2'-O-methylierten tRNA^{Sec}-Isoform (siehe 1.2.4), einhergehend mit einer Reduktion der GPX1-Expression, beobachtet werden. Der Doppel-*knockdown* von SECp43 und *soluble liver antigen* (Sla, auch Sepsecs, Secs) führte zu einer Reduktion der Selenoproteinexpression in NIH3T3-Fibroblasten (Xu *et al.* 2005). Zuvor wurde schon eine Interaktion von SECp43 mit einem 48 kDa Protein, später identifiziert als Sepsecs, nachgewiesen (Ding und Grabowski 1999). Ko-Immunopräzipitationsstudien bestätigten die Bindung von SECp43 mit Sepsecs (Xu *et al.* 2005). Weitere Bindungsanalysen mithilfe des *RNA electrophoretic mobility shift assays* (REMSA) konnten eine Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec}, gebunden an EFSec sowie auch im Komplex mit EFSec und SBP2, zeigen. Jedoch konnte auch hier eine Interaktion von SECp43 zur tRNA^{Sec} *in vitro* allein nicht beobachtet werden (Small-Howard *et al.* 2006). Dieses Ergebnis war widersprüchlich zu den vorigen Beobachtungen. SECp43 zeigte außerdem nach Ko-Transfektion in GPX1-überexprimierenden humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) unter Se-Mangel eine höhere GPX1-Expression im Vergleich zu den Zellen ohne SECp43-Ko-Transfektion. Bereits zuvor erwähnt löst Se-Mangel bei bestimmten Selenoproteinen den *nonsense mediated decay* (NMD) von deren mRNA aus. Dieser scheint durch SECp43 teils abgewendet worden sein (Small-Howard *et al.* 2006).

SECp43 ist ein hochkonserviertes 43 kDa großes Protein, bestehend aus neun Exons mit einer Gesamtlänge von 287 AS in Säugern (Accession Number: NP_082201.2) und besitzt zwei *RNA recognition motifs* (RRM) sowie C-Terminal eine Tyrosin(Tyr)-reiche Region (Abb. 1 4 A). Proteine, die RRM-Domänen (auch bekannt als *RNA-binding domain* (RBD) oder ribonucleoprotein(RNP)-Domäne) besitzen, sind in post-transkriptionale Genexpressionsprozesse involviert (Clery, Blatter, and Allain 2008). Die Tyr-reiche Region ist komplett konserviert unter 6 verschiedenen Säugerarten (Abb. 1 4 B), jedoch bisher von unbekannter Funktion.

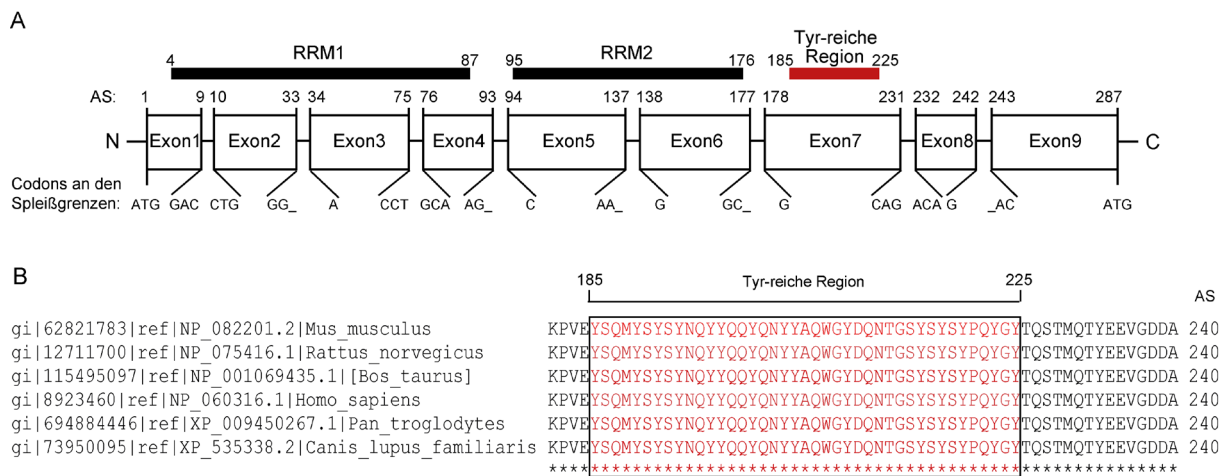


Abbildung 1-4: Schematische Struktur von SECp43 und Alignment der hochkonservierten Tyr-reichen Region. (A) SECp43-Strukturschema unter Angabe der Exons und den Codons an deren Spleißgrenzen sowie der zwei RRM-Domänen und der hochkonservierten Tyr-reichen Region. **(B)** Speziesübergreifendes Alignment der hochkonservierten Tyr-reichen Region (Maus, Ratte, Rind, Mensch, Schimpanse und Hund). Alle Aminosäuren sind konserviert, ermittelt mit der Clustal Omega Software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalo-l20141113-221330-0405-57907503-es&tool=clustalo>).

1.2.4. tRNA^{Sec}-Modifikationen und die 2'-O-methylierte tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um

Viele Basen der tRNAs werden post-transkriptional modifiziert, so auch die der tRNA^{Sec}. Diese erfolgen mitunter nahe oder innerhalb des Anticodons und beeinflussen bestimmte Schritte des Translationsprozesses (Hagervall *et al.* 1990). Die eukaryontische sowie die archaeische tRNA^{Sec} besitzen nur vier bis fünf Modifikationen im Vergleich zu den kanonischen tRNA's (15 bis 17 Modifikationen). Diese Modifikationen sind jedoch für die vollständige Expression der Selenoproteine

erforderlich. In Abbildung 1-5 ist schematisch die Struktur der eukaryontischen bzw. archaischen tRNA^{Sec} mit allen Modifikationen dargestellt. Zwei dieser Modifikationen sind das 1-Methyladenosin (m¹A) an Position 58 sowie das Pseudouridin (Ψ) an der Stelle 55 (Grosjean *et al.* 1996; Kim *et al.* 1974). Nennenswert ist vor allem die N(6)-Isopentenylierung des Adenosins (A) an der Stelle 37 in der 3'-Region direkt hinter dem Anticodon. Das Adenosin wird dadurch zu Isopentenyladenosin (i⁶A) (Hatfield *et al.* 1999). Das zuständige Enzym bei den Säugern ist die tRNA^{Sec}-Isopentenyltransferase 1 (Trit1) (Fradejas *et al.* 2013). Die vierte bedeutende Modifikation ist die 5-Methylcarboxy- Methylierung der Wobble-Base des Nukleosids Uridin an der Stelle 34, der letzten Anticodon-Position, zu 5-Methoxycarbonylmethyluridin 34 (mcm⁵U). Von zentralem Interesse für diese Arbeit ist jedoch eine weitere Modifikation, die ebenfalls an dem Wobble-Uridin erfolgt. Sie ist die zweite Methylierung an der Stelle 34, in diesem Fall an der Ribose zu 5-Methoxycarbonylmethyluridin-2'-O-Methyluridin 34 (mcm⁵Um) (Abb. 1-5 B). Diese Modifikation beeinflusst die Tertiärstruktur der tRNA^{Sec} (Diamond *et al.* 1993). Fehlen die Modifikationen im Anticodonarm, so nimmt die tRNA^{Sec} Strukturen ein, die die Interaktion mit dem Codon erschweren (Ganichkin *et al.* 2011). Die 2'-O-Methylierung der Ribose ist von den vier sich zuvor ereignenden Modifikationen abhängig (Kim *et al.* 2000) und stellt den letzten Schritt der tRNA-Reifung dar, welche jedoch nicht an jeder tRNA^{Sec} erfolgt. So existieren zwei tRNA^{Sec}-Isoformen, die sich durch die 2'-O-Methylierung der Ribose an der Stelle 34 unterscheiden: die 1-fach methylierte Form mcm⁵U und die 2-fach methylierte Form mcm⁵Um (Hatfield *et al.* 2006; Hatfield und Gladyshev 2002). Es wurde nachgewiesen, dass die 2'-O-Methylierung des Ribosyl-Rests vom Se-Status abhängig ist. Ein Se-Mangel geht mit einer Reduktion der Methylierung einher und ein hoher Se-Spiegel ist mit einer Zunahme der Methylierung verbunden. Dabei steigt, abhängig von Gewebe oder Zelltyp, der intrazelluläre Spiegel der methylierten Isoform um das 2,5-8-fache im Vergleich zum Spiegel der unmethylierten Isoform (Chittum *et al.* 1997; Choi *et al.* 1994; Diamond *et al.* 1993; Hatfield *et al.* 1991). Es deutet darauf hin, dass die 2'-O-Methylierung eine Rolle in der Regulierung der Selenoproteinbiosynthese spielt (Jung *et al.* 1994; Kim *et al.* 2000). Die Anwesenheit der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um korreliert mit der Expression bestimmter Selenoproteine. Aufgrund der Analyse einiger transgener Mausmodelle wird angenommen, dass die Isoform mcm⁵Um für die effiziente Expression stressbezogener Selenoproteine zuständig ist (z.B. Gpx1, Gpx3 und

Dio1), die unmethylierte Isoform mcm^5U hingegen für die der essentiellen Selenoproteine (z.B. Trxnd1, Trxnd3, Gpx4) (Carlson *et al.* 2007; Carlson *et al.* 2005; Chittum *et al.* 1997; Moustafa *et al.* 2001). So konnte in Isopentenyladenosin-defizienten transgenen Mäusen, denen folglich auch die Isoform mcm^5U fehlte, eine Reduktion von Gpx1 beobachtet werden. Trxnd3 hingegen war hochreguliert (Moustafa *et al.* 2001). In tRNA^{Sec} -transgenen Mäusen mit fehlender Modifikation von Isopentenyladenosin an Position 37 und Um an Position 34 konnten einige stressbezogene Selenoproteine wie z.B. Gpx1, Gpx3, SePR und SePT nicht detektiert werden. Demgegenüber wurden essentielle Selenoproteine wie z.B. Trxnd1, Trxnd3 und Gpx4 im normalen bzw. reduzierten Maß expremiert (Carlson *et al.* 2005).

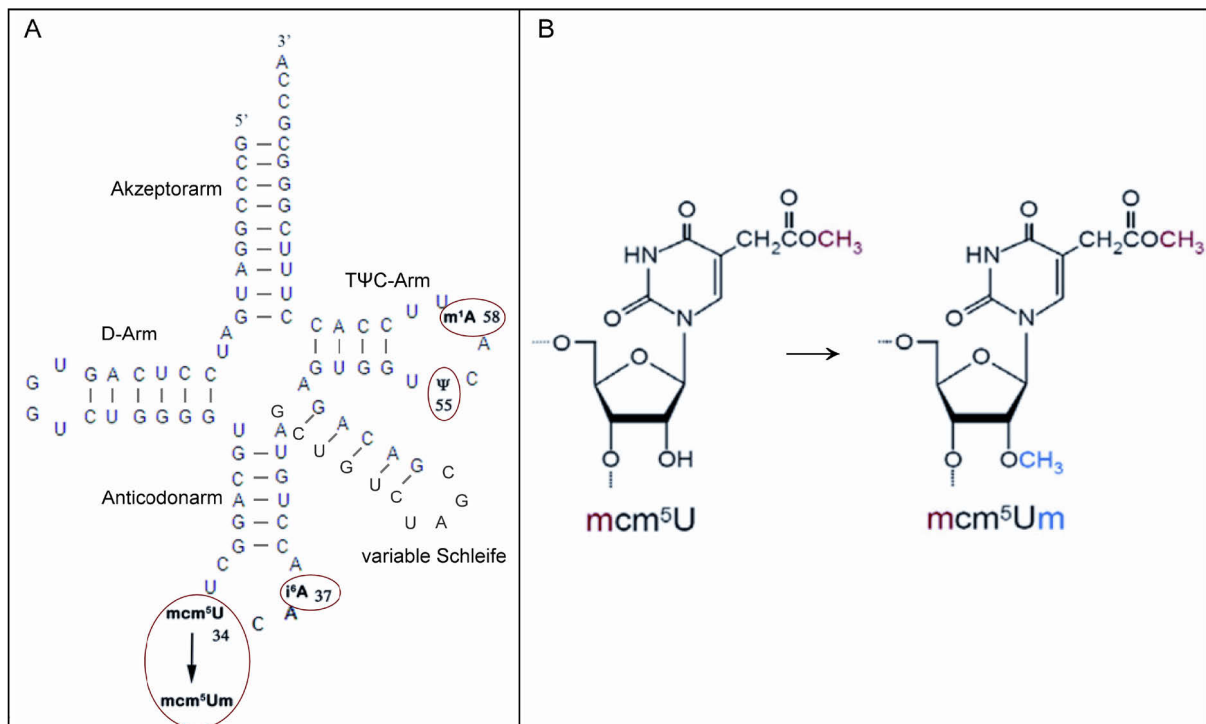


Abbildung 1-5: Eukaryontische bzw- archaische tRNA^{Sec} -Struktur mit Modifikationen und Strukturformeln der Wobble-Uridin-Isoformen. (A) tRNA^{Sec} -Struktur mit den fünf post-transkriptionalen Modifikationen: 1-Methyladenosin (m^1A) an Position 58; Pseudouridin (Ψ) an Position 55; Isopentenyladenosin (i^6A) an Stelle 37 sowie 5-Methoxycarbonylmethyluridin (mcm^5U) und 5-methoxycarbonylmethyluridine-2'-O-methyluridine (mcm^5Um) an Position 34 (modifiziert nach (Sturchler *et al.* 1994)). (B) Strukturformeln der beiden Isoformen des Wobble-Uridins mcm^5U und mcm^5Um an Position 34. 2'-O-Methylierung = blaue Schrift (Songe-Moller *et al.* 2010).

Weitere Analysen stellten jedoch diese Kategorisierung infrage. Transgene $\text{Alkbh8}^{-/-}$ -Mäuse, deren tRNA^{Sec} aufgrund der fehlenden Ester-Methylgruppe die beiden

Modifikationen an dem Wobble-Nukleosid nicht aufwiesen, zeigten nur einen sehr geringen Effekt auf die Selenoproteinexpression in verschiedenen Organen (Songe-Moller *et al.* 2010). Daraus ist zu schlussfolgern, dass der Modifikationsstatus des Wobble-Nukleosids Uridin eine geringere Relevanz für die effiziente Expression von stressbezogenen Selenoproteinen hat, als zuvor angenommen. Allerdings konnte in diesen transgenen *Alkbh8*^{-/-}-Mäusen zumindest eine Reduktion der Fähigkeit zur Umkodierung vom Stop-Codon UGA zum Sec-Codon sowie eine Reduktion des Gpx1-Spiegels nachgewiesen werden (Songe-Moller *et al.* 2010). Interessanterweise führte, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, ein *knockdown* von SECp43 zu einer Reduktion der 2'-O-Methylierung des Ribosyl-Rests des Wobble-Uridins (Xu *et al.* 2005).

1.2.5. RNA methyltransferase like 1 (RNMTL1) als Kandidat für die tRNA^{Sec}-2'-O-Methyltransferase

Bis heute ist die zuständige Methyltransferase für die 2'-O-Methylierung des Ribosyl-Rests des Wobble-Uridins an der Position 34 der eukaryontischen tRNA^{Sec} nicht bekannt. Zwei nennenswerte Kandidaten waren die *FtsJ RNA methyltransferase homolog 1 (E. coli)* (FTSJ1) und die vielversprechende *RNA methyltransferase like protein 1* (RNMTL1; auch: *rRNA methyltransferase 3, mitochondrial* (MRM3)). Bisher wurde über diese beiden Proteine im Zusammenhang mit der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um nichts publiziert. Im Fokus dieser Arbeit war die RNMTL1 als möglicher Kandidat für 2'-O-Methyltransferase der tRNA^{Sec}. Frühere Studien eines ehemaligen Mitarbeiters unserer Arbeitsgruppe, Dr. Peter Hofmann, zeigten *in vitro* eine ca. dreifache Induktion der Aktivität des stressbezogenen Selenoproteins DIO1 in stabil transfizierten RNMTL1-überexprimierenden humanen Leberkarzinom (HepG2)-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Daten nicht publiziert).

Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich der RNMTL1 ist die Annahme, dass diese in das Mitochondrium transportiert wird. Die vorhandene N-terminale *mitochondrial targeting sequence* (MTS) sowie die immunhistochemische Detektion von RNMTL1 in Mitochondrien verschiedener Zelllinien (u.a. U-2 OS, A-431 und U-251 MG) mittels des Atlas-Antikörpers gegen RNMTL1 (HPA022534) laut Hersteller-Webseite (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000171861-RNMTL1/subcellular>) deuten stark darauf hin.

Die humane RNMTL1 ist ein 420 AS langes Protein (Abb. 1-6) (Accession Number: NP_060616.1), das N-terminal mit einer 25 AS langen MTS beginnt, welche ein Protein in das Mitochondrium dirigiert. An die MTS schließt sich ein N-terminaler Linker an, gefolgt von dem bedeutenden L7Ae-RNA-Bindemotiv. Dieses Motiv ist dafür bekannt bestimmte RNA-Strukturen, sog. *kink-turns* zu binden, welche vorwiegend in Ribosomen zu finden sind, aber auch im SECIS-Element vorkommen. Die meisten, wenn nicht alle *kink-turns* sind nach dem Vergleich von Säugern und Archaeen in der 28S rRNA konserviert (Hamma und Ferre-D'Amare 2004; Huang und Lilley 2013). Nach dem L7Ae-Bindemotiv schließt sich ein kurzer zentraler Linker an, gebunden an die SpoU-Methylase-Domäne. Diese ist für die spezifische Aktivität des Proteins zuständig. Die SpoU-Methyltransferasen bilden eine RNA-Methylase-Superfamilie, benannt nach dem *E.coli*-Protein SpoU, das in diesen als tRNA-Methyltransferase der Position G¹⁸ identifiziert wurde (Anantharaman *et al.* 2002). Abschließend befindet sich ein C-terminaler Linker von 20 AS Länge. Kurz nach Abschluss der Nachforschungen über die RNMTL1 während dieser Arbeit wurde diese von Lee *et al.* im Oktober 2013 als die zuständige Methyltransferase für die 2'-O-Methylierung der Ribose von Guanosin(G)¹³⁷⁰ des 16S-rRNA-Kerns der humanen großen mitochondrialen Ribosomenuntereinheit identifiziert (Lee *et al.* 2013).

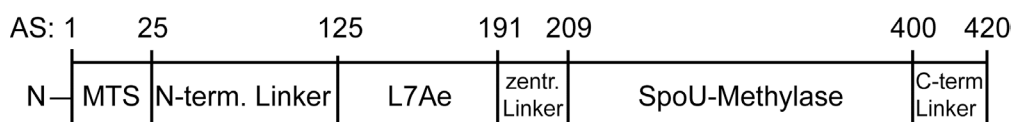


Abbildung 1-6: Schematische Struktur von humanem RNMTL1-Protein. MTS = *mitochondrial targeting sequence*, N-term. Linker = N-terminaler Linker, L7Ae = RNA-Bindemotiv, zentr. Linker = zentraler Linker, SpoU-Methylase = tRNA-Methyltransferase, C-term. Linker = C-terminaler Linker.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Es wurde bereits eine Bindung von SECp43 an die tRNA^{Sec} sowie eine Reduktion der Selenoproteinexpression nach dem *knockdown* von SECp43 in kultivierten Zellen beschrieben. Basierend auf diesen Daten wird SECp43 eine Beteiligung in der Selenoproteinbiosynthese zugesprochen. Jedoch ist dessen Funktion bisher unbekannt. Um diese Funktion zu untersuchen, sollte der Einfluss von SECp43 auf die Selenoproteinexpression *in vivo* am Mausmodell analysiert werden. Dafür wurden

von unserem Kooperationspartner Dr. Dolph Hatfield an den National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA zwei Mausmutanten generiert. Dabei stellte sich die Mutante mit der konstitutiven *out of frame*-Deletion der Exons 7 und 8 sich als embryonal letal heraus. Diese embryonale Letalität war auch bei den konstitutiven Inaktivierungen der tRNA^{Sec} sowie auch von Secisbp2 zu beobachten, was auf eine gestörte Selenoproteinexpression zurückgeführt werden konnte. Demzufolge war das Hauptziel dieser Arbeit die Generierung eines dementsprechenden konditionalen SECp43-*knockouts* über Deletion der Exons 7 und 8 in den Hepatozyten sowie die Untersuchung deren Selenoproteinexpression. Mithilfe dieser Experimente sollte die Rolle von SECp43 in der Selenoproteinbiosynthese nachgewiesen werden.

Es wurde bereits die Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vivo* sowie *in vitro* im Komplex mit anderen Faktoren im *RNA electrophoretic mobility shift assay* (REMSA) beschrieben. Zudem konnte jedoch unerwarteterweise eine direkte Bindung von SECp43 an die tRNA^{Sec} allein *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die Überprüfung dieser Befunde dar, in dem erneut die Interaktion beider Komponenten unter verschiedenen Bedingungen mittels REMSA getestet wurden.

Das zweite Projekt dieser Arbeit befasste sich mit der Hypothese, dass RNMTL1 die bisher unbekannte 2'-O-Methyltransferase der tRNA^{Sec} ist. Diese führt zur tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um, in dessen Anwesenheit eine Korrelation mit der Expression stressbezogener Selenoproteinen angenommen wird. Als Ziel dieses Projekts sollten die Daten früherer Experimente, die eine Induktion der Enzymaktivität des stressbezogenen Selenoproteins DIO1 in RNMTL1 überexprimierenden HepG2-Zellen zeigten, zur Bestätigung mit mehreren stabil-transfizierten HepG2-Zellklonen reproduziert werden. Zudem sollten verschiedene Deletionsmutanten der RNMTL1 nach dem gleichen Prinzip getestet werden, um die für die Aktivität essentiellen Domänen zu ermitteln.

Als zusätzlicher Anhaltspunkt für die Hypothese der RNMTL1 als mögliche 2'-O-Methyltransferase wurde die Interaktion von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec} im REMSA untersucht.

Ein weiterer Aspekt dieses Projekts war die Untersuchung des Transports und Lokalisation von RNMTL1 im Mitochondrium. Anhaltspunkte dafür waren die vorhandene *mitochondrial targeting sequence* (MTS) und die immunohistochemische

Detektion von RNMTL1 in den Mitochondrien mittels RNMTL1-spezifischer Antikörper.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die für die Experimente verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Herstellern erworben: Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim).

Die verwendeten Puffer, Lösungen und Medien sowie deren genaue Zusammensetzung werden im entsprechenden Methodenteil aufgeführt.

Im Labor verwendete Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht extra angegeben, von folgenden Herstellern erworben: Amersham Biosciences (Freiburg), A. Hartenstein (Würzburg), Bio-Rad Laboratories (München), GE Healthcare (München), Life Technologies (Darmstadt), Merck Biosciences (Schwalbach), Eppendorf (Hamburg), PEQLAB Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim), Thermo Scientific (Rockford, USA).

Für die Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien, Medien und Zusätze wurden von folgenden Herstellern bezogen: Biochrom (Berlin), Life Technologies (Darmstadt) und TPP Techno Plastic Products AG (Trasdingen, Schweiz).

2.1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von NEB (Ipswich, USA) bezogen. Alle weiteren verwendeten Enzyme sind im entsprechenden Methodenteil aufgeführt.

2.1.3. Geräte

Tabelle 2-1: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugstation Vacusafe comfort	IBS INTEGRA Biosciences GmbH (Fernwald)
Autoklav Varioclav	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Bas-Reader BAS-1800 II	FUJIFILM Europe GmbH (Düsseldorf)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)

Dismembrator Modell U	B. Braun Biotech (Melsungen)
Elektrophorese-System vertikal: Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektrophoresekammer vertikal: PerfectBlue	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Doppelgelsystem Twin ExW S Modell 45-2010-I	
Elektrophoresekammer horizontal: BlueMarine 200	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
Entwicklungsgerät X-OMAT 1000	Kodak Company (Rochester, NY, USA)
Geldokumentationssystem Alphamager EC	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)
Geltrockner Slab SGD 2000	Savant (Midland, MI, USA)
Feinwaage Ultramicro 4504MP8	Sartorius (Göttingen)
Image Eraser	Raytest (Straubenhardt)
Imaging Plate Bas-MS 2325	Fujifilm (Japan)
Inkubator Zellkultur HERA cell	Heraeus Instruments (Hanau)
Inkubationsschüttelschrank GFL 3033	GFL (Burgwedel)
Inverses Mikroskop Wilovert 30 Standard	Hund (Wetzlar)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter (Krefeld)
Laborwaage CP 2201	Sartorius (Göttingen)
Magnetrührer Modell L32	A.Hartenstein (Würzburg)
Mastecycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Mastercycler nexus GSX1 gradient flexlid	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle M501	Whirlpool (Schorndorf)
Mikrozentrifuge Micro-Spin FV-2400	A.Hartenstein (Würzburg)
Multi-Purpose Scintillation Counter LS 6500	Beckman Coulter (Krefeld)
Netzgerät BluePower Plus	SERVA (Heidelberg)
Netzgerät EPS 601 Power Supply	Amersham Biosciences (Freiburg)
Netzgerät PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories (München)
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW (Weilheim)
Pipetten Eppendorf research 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe acu-jet pro	Hartenstein (Würzburg)
Photometer Jenway 6300	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Photometer Nanodrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Photometer Plate Reader Genios	Tecan (Crailsheim)
Photometer Specord 205	analytikjena (Jena)
Präparierbesteck	FST Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reinstwasser-Anlage EASYpure UVTM	Barnstead International (Dubuque, IA, USA)
Röntgenfilmkassette	Kodak (Rochester, USA)
Schutzschild Isotopenlabor	Amersham Biosciences (Freiburg)
Schüttler GFL 3016	GFL (Burgwedel)
Schüttelwasserbad GFL 1086	GFL (Burgwedel)
Spectrometer S2 PICOFOX	Bruker (Madison, WI, USA)
Sterilbank Holten LaminAir Model 1.2	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterilbank HERAsafe LaminAir HB2448	Heraeus Instruments (Hanau)
Thermocycler Primus	MWG-Biotech (Ebersberg)
Thermocycler Primus96 plus	MWG-Biotech (Ebersberg)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Transferblotapparatur Trans-Blot SD Semi-Dry Tr: Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Ultraschallstab Labsonic M	B.Braun Biotech (Melsungen)
Ultraschallstab Sonifier 250	Branson Ultrasonic (Dietzenbach)
UV-Transilluminator, V-90M	Benda (Weisloch)

Vakuumpumpe LABOPORT N840.3 FT.18	KNF Neuberger GmbH (Freiburg)
Vacuumpumpe Universal Vacuum System Plus UVS400A	Savant (Midland, MI, USA)
Vortex	A.Hartenstein (Würzburg)
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus (Hanau)

2.1.4. Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits):

Tabelle 2-2: verwendete Reagenzsysteme

Reagenzsystem	Hersteller/Bezugsquelle
Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Bio-Rad DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories (München)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories (München)
FastPlasmid Mini	Eppendorf (Hamburg)
KAPA HiFi PCR Kit	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Perfectprep Gel Cleanup	Eppendorf (Hamburg)
Pierce Spin Column Kit	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega (Madison, WI, USA)
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega (Madison, WI, USA)
Wizard Plus Minipreps DNA Purification System	Promega (Madison, WI, USA)

2.1.5. Software und Datenbanken

Tabelle 2-3: Verwendete Software.

Name	Hersteller/Bezugsquelle
6 ₃ -Zero	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Adobe Illustrator 10	Adobe Systems GmbH (München)
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH (München)
AlphaView Version 1.3.0.7	ProteinSimple (Santa Clare, CA, USA)
BioEdit 7.1.3.0	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
EndNote	Thomson Reuters (New York, NY, USA)
ExPASy Translate tool	http://web.expasy.org/translate/
GraphPad Prism 4 Version 4.01	GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA)
ImageJ 1.44p	http://imagej.nih.gov/ij
Microsoft Office Professional Plus 2010	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
NanoDrop 1000 Software	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Primer3Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
QuickCalc	http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm
Winaspect	analytikjena (Jena)
XFluor4	Tecan (Crailsheim)
Biophotometer Online Version 1.01	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 2-4: Verwendete Datenbanken

Name	Internetadresse
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Clustal Omega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

2.1.6. Vektoren/Plasmide

Tabelle 2-5: Verwendete Vektoren

Plasmid	Hersteller
pCDH (CD513B-1)	System Bioscience (Mountain View, CA, USA)
pcDNA3.1/ V5-His Topo	Life Technologies/Invitrogen (Darmstadt)
pET-52b(+) Vector	Novagen/Merck KGaA (Darmstadt)
pGEM-T Easy Vector Systems	Promega (Mannheim)
psPAX2 + pMD2.G	Addgene (Cambridge, MA, USA)

2.1.7. Antikörper

Tabelle 2-6: verwendete Antikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung Western Blot	Hersteller
goat α -rabbit	1:2000	Dako (Hamburg)
goat α -mouse	1:2500	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
mouse α -His	1:1000	Waldemar Minich
mouse α -Txnrd1 (ab16847)	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
mouse α -V5	1:5000	Life Technologies/Invitrogen
rabbit α -Cox IV (ab16056)	1:2000	Abcam (Cambridge, UK)
rabbit α -GPX1 (ab 22604-100)	1:2000	Abcam (Cambridge, UK)
rabbit α -GPX2	1:5000	Antiserum (Florian <i>et al.</i> 2010)
rabbit α -GPX4 (ab40993-100)	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
rabbit α -Dio1	1:2000	Antiserum 1068 (Kuiper <i>et al.</i> 2003)
rabbit α -RNMTL1	1:2000	Atlas (Stockholm, Schweden)
rabbit α -SePK	1:500	Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)
rabbit α -SePP	1:400	ImmunoGlobe (Himmelstadt)
rabbit α -SePS	1:1000	Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)
rabbit α -SepSecS	1:1000	Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)
rabbit α -TRNAU1AP	1:250	Atlas (Stockholm, Schweden)
rabbit α - β -Aktin	1:2000	Rockland (Limerick, PA, USA)
rabbit α - β -Aktin	1:25000	Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)

2.1.8. Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

Tabelle 2-7: verwendete Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

Bakterienstamm	Eukaryontische Zelllinie (Zelltyp)
One Shot BL21 Star (DE3) Chemically competent <i>E. coli</i>	HEK-293T (Humane embryonale Nierenzelllinie; T = SV40 large T-Antigen)
DH5- α <i>E. coli</i>	HepG2 (Humane Leberkarzinom-Zelllinie)
dam-/dcm- Competent <i>E. coli</i>	

2.1.9. Mauslinie

Die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}* wurde in den Versuchstierhaltungen der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin und des Hauses für experimentelle Therapie (HET) des Universitätsklinikums Bonn, nach Vorgaben der jeweiligen lokalen Behörden, gezüchtet und gehalten. Experimente wurden nur mit Organen durchgeführt, die aus kurz zuvor getöteten Tieren entnommen worden waren.

Die untersuchten *knockout*(KO)-Mäuse wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Dolph Hatfield an den National Institutes of Health (NIH, Mouse Cancer Genetics Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) generiert (siehe Abschnitt 3.1.1.1) (Mahdi *et al.* 2015), aber nicht weiterführend analysiert. Die spezifische Inaktivierung von *Secp43* in den Hepatozyten erfolgte mithilfe des *Cre/loxP*-Systems, wobei die zu deletierenden Exons mit *loxP*-Erkennungsstellen flankiert waren. Durch Verpaarungen von *floxed Secp43*(*Secp43^{fl/fl}*)-Mäusen mit transgenen *Alb-Cre*-Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin Promotors exprimieren (Seeher, Atassi, *et al.* 2014), wurden Exon 7 und 8 der 9 Exons *out of frame* deletiert. Das letzte Exon war dadurch ebenfalls betroffen und es konnte kein vollständiges Protein mehr exprimiert werden.

Die Zucht der untersuchten Mäuse wurde jeweils nach dem gleichen Verpaarungsschema durchgeführt, um verschiedene maternale bzw. paternale Effekte auf die Nachkommen auszuschließen. Dabei wurde ein heterozygotes Tier für *floxed Secp43* und *Cre⁺ (fl/Wt⁺)* mit einem Tier homozygot für *floxed Secp43* und *Cre⁻ (fl/fl)* verpaart. Daraus resultierten geschlechtsunabhängig entweder homozygote *Cre⁺*-Nachkommen (*fl/fl⁺*), heterozygote *Cre⁺*-Nachkommen (*fl/Wt⁺*),

homozygote $Cre^{-}(fl/fl)$ -Tiere sowie heterozygote $Cre^{-}(fl/Wt)$ -Nachkommen. Somit blieb die Gendosis für Cre (heterozygot) immer gleich.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Genotypisierung der *Alb-Cre*; *Secp43^{fl/fl}*-Mäuse

Tabelle 2-8: Genotypisierungs-PCRs *Alb-Cre* und *Secp43^{fl/fl}*

<i>Alb-Cre</i>:	
PCR-Ansatz	PCR-Programm
1 µl DNA	
3 µl 10x SupraTherm™ Puffer +15 mM MgCl ₂ (Gene Craft)	94°C – 5 min
1,5 µl 5 mM dNTP-Mix (Eppendorf)	95°C – 30 s
je 1 µl 10 µM Primer (Fwd; Rev)	57°C – 30 s 35 Zyklen
0,2 µl 5 U/µl SupraTherm™ Taq (Gene Craft)	72°C – 45 s
ad 30 µl dH ₂ O	72°C – 3 min
Primersequenzen:	Produkt
Fwd: 5'- ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT - 3'	Ca. 370 bp
Rev: 5'- ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT - 3'	
<i>Secp43^{fl/fl}</i>:	
PCR-Ansatz	PCR-Programm
1 µl DNA	
3 µl 10x SupraTherm™ Puffer +15 mM MgCl ₂ (Gene Craft)	95°C – 5 min
1,5 µl 5 mM dNTP-Mix (Eppendorf)	95°C – 30 s
0,9 µl 50 mM MgCl ₂	58°C – 1 min 35 Zyklen
je 1 µl 10 µM Primer (Fwd; Rev)	72°C – 1 min
0,1 µl 5 U/µl SupraTherm™ Taq (Gene Craft)	72°C – 3 min
ad 30 µl dH ₂ O	
Primersequenzen:	Produkt
Fwd: 5'- CATGTGGGTCAGGGATCTTC - 3'	<i>floxed</i> : 410 bp
Rev: 5'- CAAATGCTAATCAAAAGATGTCA - 3'	Wildtyp: 310 bp

Die Genotypisierung erfolgte durch die Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Abschnitts mittels PCR. Um die Nachzucht der *Alb-Cre*; *Secp43^{fl/fl}*-Mäuse genotypisieren zu können, wurde DNA aus Ohrloch- bzw. Schwanzbiopsien gewonnen. Dazu wurden die Biopsien entsprechend ihrer Größe mit 50 - 100 µl alkalischem Lysepuffer (Chomczynski und Rymaszewski 2006) versetzt, gemischt, für ca. 1 - 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und davon 1 µl für die PCR eingesetzt. Da es sich um eine konditionale Inaktivierung von *Secp43* in der Leber handelt, mussten zwei verschiedene Genotypisierungs-PCR's durchgeführt werden, einmal für *Secp43^{fl/fl}* und einmal für *Alb-Cre*. Die jeweiligen PCR-Ansätze, Primersequenzen

und PCR-Programme sind in der Tabelle 2-8 aufgelistet. Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.1.4).

2.2.1.2. Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Die *quantitative real time* PCR ist eine Methode zur selektiven Amplifikation und zeitgleichen Quantifizierung eines spezifischen DNA-Abschnitts. Mithilfe der qRT-PCR können Genexpressionsmuster z.B. in Organen untersucht werden.

Alle für diese Arbeit erfolgten qRT-PCRs (inklusive RNA-Isolation aus Mausleberpulver und cDNA-Synthese) wurden von Dr. med. dent. Paul Günter im Zuge seiner medizinischen Doktorarbeit durchgeführt. Materialien und genaue Durchführung sind seiner Doktorarbeit zu entnehmen. Die dafür von ihm verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-9: verwendete Primer für die qRT-PCR

Primer	Nukleotidsequenz (5' zu 3')	Primer	Nukleotidsequenz (5' zu 3')
<i>Dio1</i>	Fwd: CACAGCCGATTTCTCATCA Rev: GCTGCTCTGGTTCTGCATTG	<i>Sepc43</i> <i>exon 7/8</i>	Fwd: ACCAGAACTACTATGCCCAGTG Rev: ATTATTCTAGGCCTCTGCCTTC
<i>eIF4a3</i>	Fwd: AAGAGGAGGACATGACCAAAG Rev: CAGACTGAGACTGTGCAATGAC	<i>Sepp1</i>	Fwd: GTTGAAGAAGCCATTAAGATCG Rev: ATTCTCTGAAGGCTTACTGCTG
<i>Gpx1</i>	Fwd: ATCAGTTCGGACACCAGGAG Rev: CATTCCGCAGGAAGGTAAAG	<i>Sepsecs</i>	Fwd: CTACAGGAAGCTGTTGAAGGAG Rev: TTTGTCATGGTGTCCATCTATC
<i>Gpx4</i>	Fwd: ATGCCATCAAATGGAACCTTAC Rev: GTGTAGGGGCACACACTTGTA	<i>Serrs Tk1 1+2</i>	Fwd: GAATATTGTCTCAGGCTCCTTG Rev: GGGTGGTAGCACACATTGTAG
<i>Pstk</i>	Fwd: CATGTTTGAAGAGGAATGGTGA Rev: TCCAATGCAGTAAGCAACAAAC	<i>Sephs2</i>	Fwd: TAGCTTGTGCCAATGTGCTC Rev: TAATCCACGGGTTGACCACT
<i>Secisbp2</i>	Fwd: GGCCACCTACTATCCATTTGTA Rev: GTGTAAGTGGGATAGGCAAAAG	<i>Txnrd1</i>	Fwd: CAAATTTGACAAGAAAGTGCTG Rev: AGTCATGCTTCACTGTGTCTTC
<i>Sepc43</i> <i>exon 3/4</i>	Fwd: TGCATAAAATTAATGGGAAACC Rev: AGGGAGTACTCAGGGCTATTGT		

2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Klonierung

DNA-Fragmente wurden über die PCR, wie schon unter Punkt 2.2.1.1. erwähnt, vervielfältigt. Zur fehlerfreien Klonierung von DNA-Fragmenten wurde für die PCR das KAPA HiFi PCR Kit verwendet. Die dort enthaltene HiFi-DNA-Polymerase verfügt über eine erhöhte Korrekturlese-Aktivität. Reaktionsansatz und -bedingungen entsprechend der Herstellerangaben sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2-10: Klonierungs-PCR mit KAPA HiFi PCR Kit

PCR-Ansatz	PCR-Programm
1-10 ng DNA	
5 µl 5x KAPA HiFi Fidelity Puffer (+2 mM MgCl ₂)	95°C – 3 min
0,75 µl 10 mM KAPA dNTP-Mix	98°C – 20 s
je 1 µl 10 µM Primer (Fwd; Rev)	60-75°C – 30 s 35 Zyklen
0,5 µl KAPA HiFi DNA Polymerase (1 U/µl)	72°C – 60 s/kb
ad 25 µl dH ₂ O	72°C – 3 min

2.2.1.4. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Proben, z.B. nach PCR- oder Restriktionsreaktionen wurden die DNA-Proben in einem Agarosegel elektrophoretisch in 1x TAE-Puffer (Tab. 2-11) nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Agarosegels entsprach, je nach der zu erwartenden Größe, 0,8 - 1,5 % und wurde zur Visualisierung mit Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer (Tab. 2-11) versetzt und entsprechend der Größe für 20 bis 60 min bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde immer ein DNA-Größenstandard (Gene Ruler 1 kb DNA ladder plus, Fermentas, St.Leon-Rot) mitgeführt. Die Geldokumentation erfolgte unter UV-Licht durch Fotografie.

2.2.1.5. A-tailing und Ligation

Wurde eine TA-Klonierung durchgeführt, musste die zu klonierende DNA vor der Ligation mit A-Überhängen versehen werden. Das *A-tailing* erfolgte in einem 30 µl Ansatz mit 22 µl PCR-Produkt, 3 µl dATPs, 3 µl 10x SupraTherm™ Puffer und 0,5 µl SupraTherm™ Taq-Polymerase bei 72°C für 30 min.

Für eine Ligation wurden 20 - 50 ng linearisierter Vektor mit dem dreifachem molaren Überschuss an zu klonierender DNA, 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl T4-DNA-Ligasepuffer in einem 10 µl Ansatz bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.6. Hitzeschock-Transformation

Für die Hitzeschock-Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien wurden in dieser Arbeit die *E.coli*-Stämme DH5 α und BL21 Star verwendet. Dabei wurden 50 μ l chemisch-kompetente *E.coli* Bakterien mit 5 μ l eines Ligationsansatzes oder 5 - 10 ng aufgereinigter Plasmid-DNA versetzt. Dann erfolgte eine Inkubation des Reaktionsmix auf Eis, der Hitzeschock bei 42°C für 45 s und anschließender Abkühlung für 2 min erneut auf Eis. Daraufhin wurden 500 μ l LB-Medium (Tab. 2-11) hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C und 600 rpm für 1 h inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz auf LB-Agar-Platten (Tab. 2-11), welche 100 μ g/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.7. Ansetzen einer Übernachtskultur und Plasmid-DNA Isolation

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* Bakterien, mussten diese zunächst vervielfältigt werden. Dazu wurden Übernachtskulturen von je 3 ml LB-Medium plus 100 μ g/ml Ampicillin mit gepickten Einzelklonen angeimpft, die zuvor auf den LB-Agar-Platten über Nacht angewachsen waren (siehe 2.2.1.6). Diese wurden dann über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mithilfe des FastPlasmid™ Mini-Kits wurde am folgenden Tag nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen isoliert.

War eine größere Menge an Plasmid-DNA erforderlich, wurden 50 ml (LB-Medium plus 100 μ g/ml Ampicillin) einer Übernachtskultur angeimpft und die Plasmid-DNA mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System Kit isoliert.

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurde am NanoDrop 1000 photometrisch bei 260 nm durchgeführt.

Tabelle 2-11: Puffer der DNA-Gelelektrophorese und der Bakterienkultivierung

Puffer	Zusammensetzung
6x DNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (w/v) Glycerin in dH ₂ O
50x TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 mL Eisessig, 18,5 g Na ₂ EDTA x 2H ₂ O, dH ₂ O ad 1 L
Gebrauchslösung (1x):	1:50-Verdünnung des 50 x TAE-Puffers in dH ₂ O
LB-Agar	20 g in 1 l dH ₂ O
LB-Medium	35 g in 1 l dH ₂ O

2.2.1.8. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Sequenzierungsfirma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10 µl (1 µg) der zu sequenzierenden DNA-Probe mit 4 µl (5 µM) des benötigten Primers versetzt und der Firma per Post zugeschickt. Die ermittelten Sequenzen wurden digital übermittelt und mit der BioEdit Software ausgewertet.

2.2.1.9. Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 300 - 400 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zu einem 10 µl Reaktionsansatz wurden 1 U/µg DNA des Restriktionsenzym und 1 µl des entsprechenden Enzympuffers (10x) zugesetzt. Dann wurde der Ansatz bei 37°C für 30 - 60 min inkubiert.

Für einen präparativen Restriktionsansatz von 50 µl wurden 1 - 3 µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkt eingesetzt, die ebenfalls mit 1 U/µg DNA des Restriktionsenzym und 5 µl des entsprechenden Enzympuffers (10x) versetzt wurden. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

Wurde ein Plasmid nur mit einem Restriktionsenzym verdaut, erfolgte eine Dephosphorylierung des geschnittenen Plasmids zur Vermeidung einer Re-Ligation. Dazu wurden 2 µl *Shrimp* Alkalische Phosphatase (SAP; Fermentas, St.Leon-Rot) und 5 µl 10x SAP-Reaktionspuffer zu dem Restriktionsansatz hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die SAP wurde danach bei 65°C für 20 min hitzeinaktiviert.

2.2.1.10. Klonierungen

Klonierung von RNMTL1-Mutanten in lentivirale Vektor

Zur Transduktion von *RNMTL1*-Konstrukten in HepG2-Zellen wurden die *RNMTL1*-Mutanten *Del-MTS*, *Del-NTerm* und *Del-L7Ae*, sowie der *RNMTL1*-Wildtyp (Wt), in den lentiviralen Vektor pCDH kloniert. Die Deletionsmutationen wurden über PCR (siehe 2.2.1.3) generiert und alle DNA-Fragmente amplifiziert. Dabei wurden die *forward* Primer (Tab. 2-12) so gewählt, dass die *RNMTL1*-Sequenz entsprechend der

gewählten Deletion verkürzt wurden. Über den *reverse* Primer wurde ein V5- und His-Tag am 3'Ende angefügt. Der Ausgangsvektor mit der *RNMTL1*-Sequenz wurde von Niels-Peter Becker zur Verfügung gestellt. Die PCR-Reaktionen wurde danach gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.1.4) und die Amplifikate mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit entsprechend der Herstellerangaben aus dem Agarosegel eluiert. Für die Subklonierung der Amplifikate in den pGEM-T Easy Vektor war die Generierung von A-Überhängen erforderlich. Das A-tailing der Amplifikate erfolgte bei 72°C für 30 min (siehe 2.2.1.5). Die Amplifikate wurden nun mit dem Vektor bei 4°C über Nacht ligiert (siehe 2.2.1.5). Anschließend wurden DH5α *E.coli* Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe 2.2.1.6), Übernachtskulturen angesetzt und aus diesen am folgenden Tag die Plasmide isoliert (siehe 2.2.1.7) und anschließend sequenziert (siehe 2.2.1.8). Zur Vervielfältigung einer positiv getesteten Plasmid-DNA wurde von der entsprechenden Bakterienkolonie eine 50 ml Übernachtskultur angesetzt. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.2.1.7) und die DNA-Konzentration am NanoDrop 1000 bestimmt. Nun erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.9) der vier verschiedenen Konstrukte und des Zielvektors pCDH (zur Verfügung gestellt von Niels-Peter Becker) jeweils mit *EcoRI*. Dieses schneidet auf beiden Seiten des Polylinkers des pGEM-T Easy. Die Restriktionsansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert (s.o.). Alle vier *RNMTL1*-Fragmente wurden jeweils in den geschnittenen dephosphorylierten (siehe 2.2.1.9) Vektor pCDH ligiert, die Konstrukte anschließend in DH5α *E.coli* Bakterien transformiert, eine Plasmid-Mini-Präparation durchgeführt und die Plasmid-DNA-Konzentration bestimmt (s.o.). Zuletzt wurden die Plasmid-Proben sequenziert und positiv getestete Plasmid-DNA über eine Plasmid-Midi-Präparation vervielfältigt (s.o.). Die Plasmid-Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C konserviert.

Tabelle 2-12: Primersequenzen für Klonierung von *RNMTL1*-Konstrukten in lentivriale pCDH

Primernamen	Primersequenz
RNMTL1_Fwd (Wt)	AAGCTTCAGGGAACATGGCGGCGCTGGTGAGACCCGC
RNMTL1_DeIMTS_Fwd	AAGCTTCAGGGAACATGCCAGTGAAAGTGGTGTTC
RNMTL1_DeINTERM_Fwd	AAGCTTCAGGGAACATGGAAGAGTCTGGGCTTCGCTACGA TAAAG
RNMTL1_DeIL7Ae_Fwd	AAGCTTCAGGGAACATGGCCAAGCCTGACCATGTAAAG
V5_6HIS_RNMTL1_Rev	TCTAGATTACGTACTGTCGAGCCCCAGGAGAGGATTGGGT ATAGGTTTCCCATGGTGATGGTGATGGTGCCCCCGTGGT AACTCCTGTCCCTGCTCAAGTC

Klonierung von RNMTL1-Mutanten in pcDNA3.1/V5-His-TOPO

Um, die zuvor in den lentiviralen Vektor zur Transduktion eingebrachten, *RNMTL1*-Mutanten (siehe vorherigen Abschnitt) in HepG2-Zellen alternativ stabil zu transfizieren, wurden diese in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO kloniert. Dazu diente das Konstrukt *RNMTL1*-Wt-pCDH als Ausgangsvektor. Die Deletionsmutanten wurden wie oben beschrieben, über PCR (siehe 2.2.1.3) mithilfe entsprechender Primer generiert, die zudem eine *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle an den Enden anfügten (Tab. 2-13). Die PCR-Reaktionen wurden wie oben beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Amplifikate aus dem Agarosegel eluiert (siehe 2.2.1.4). Sowohl die Amplifikate als auch der Vektor wurden nun direkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Der Vektor wurde anschließend dephosphoryliert (siehe 2.2.1.9). Die Ansätze wurden erneut über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert, die Konzentration bestimmt und *RNMTL1*-Fragmente jeweils mit dem linearisierten Vektor ligiert (s.o.). Es folgte die Transformation der Ligationsansätze in DH5α *E.coli* mit anschließender Plasmid-Mini-Präparation, eine Restriktionsanalyse und Sequenzierung der isolierten Konstrukte sowie die Vervielfältigung positiv getesteter Konstrukte (s.o.). Diese wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 2-13: Primersequenzen für Klonierung von *RNMTL1*-Konstrukten in pcDNA3.1/V5-His-TOPO

Primernamen	Primersequenz
BamHI_RNMTL1_Fwd (Wt)	ATGCGGATCCCAGGGAACATGGCGGCGCTGGTGAGACC CGC
BamHI_RNMTL1_DeIMTS_Fwd	ATGCGGATCCCAGGGAACATGCCAGTGAAAGTGGTGTTT C
BamHI_RNMTL1_DeINTERM_Fwd	ATGCGGATCCCAGGGAACATGGAAGAGTCTGGGCTTCGC TACGATAAAG
BamHI_RNMTL1_DeIL7Ae_Fwd	ATGCGGATCCCAGGGAACATGGCCAAGCCTGACCATGTT AAG
EcoRI_V5_6HIS_RNMTL1_Rev	ATGCGAATTCTTGTGGTAACTCCTGTCCCTGCTCAAGTC

Klonierung von RNMTL1 und Secp43 in den Expressionsvektor pET52b(+)

Zur rekombinanten Expression von RNMTL1 und SECp43 wurden diese in den Expressionsvektor pET52b(+) kloniert. Die Sequenz von *RNMTL1* wurde aus dem Ausgangsvektor *RNMTL1*-Wt-pCDH und die *Secp43*-Sequenz aus der HepG2-cDNA

(zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Hofmann) mittels PCR amplifiziert (siehe 2.2.1.3). Da der C-terminale His-Tag für die Aufreinigung verwendet wurde, wurde der N-terminale Strep-Tag II aus der Vektorsequenz über entsprechend gewählte *forward* Primer entfernt (Tab. 2-14). Die PCR-Ansätze wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (s.o.). Anschließend wurde das *RNMTL1*-Fragment mit *Clal* und *SacI* und das *Secp43*-Fragment mit *XbaI* und *SacI* an den durch die PCR jeweils angefügten Schnittstellen verdaut (s.o.). Entsprechend wurde auch jeweils der Vektor verdaut. Dieser musste für den Verdau mit *Clal* zuvor in einen *dam*⁻ *E.coli*-Stamm transformiert werden, da *Clal* nur an unmethylierten (*dam*⁻) Schnittstellen schneiden kann. Nach Plasmidpräparation und Konzentrationbestimmung (s.o.), wurden die beiden Fragmente jeweils in den Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH5α *E.coli* transformiert, gefolgt von einer Plasmid-Mini-Präparation mithilfe des Wizard Plus Minipreps DNA Purification System. Danach wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die Plasmid-DNA sequenziert (s.o.). Zur anknüpfenden Proteinexpression wurden positiv getestete Konstrukte in BL21 StarT™ (DE3) *E.coli* Bakterien transformiert.

Tabelle 2-14: Primersequenzen für Klonierungen in den Expressionsvektor pET52b(+)

Primername	Primersequenz
Clal-T7-Lac-rbs-Rnmtl1-Wt_Fwd	ATGCATCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAA CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCGGCGCTGGTGAGACCCGC
Sac1_Rnmtl1_Rev	ATGCGAGCTCGTGGTAACTCCTGTCCCTGCTCAAGTC
Xba1-rbs-Secp43-Fwd	ATGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCAT GGCGGCCAGCCTGTGG
Sac1-Secp43-Rev	ATGCGAGCTCCATCATGGCAGGGATCTCTGAAGACAC

2.2.1.11. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Für die Synthese eines *in vitro* Transkripts zur anschließenden *in vitro* Translation von SECp43 wurde die *Secp43*-DNA-Sequenz aus dem Plasmidkonstrukt pET-52b(+)-*Secp43* mittels PCR (siehe 2.2.1.3) amplifiziert. Zur Kontrolle der Integrität des Amplifikats wurde 1 µl der Reaktion über ein Agarosegel (siehe 2.2.1.4) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts mithilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion. Der PCR-Reaktionsansatz wurde dabei mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch in einem Verhältnis von 25:24:1 versetzt und gut gemischt, bis sich eine Emulsion gebildet hatte. Danach

wurde der Ansatz bei 14000 rpm und RT für 4 min zentrifugiert, die DNA-enhaltende wässrige Oberphase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser wurde ein Volumen Chloroform (Extraktion des Phenols) gegeben, gut gemischt und anschließend erneut bei 14000 rpm und RT für 4 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut in ein Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgte die DNA-Präzipitation mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5x Volumen kaltes 100%iges Ethanol, woraufhin sich eine DNA-Flocke bildete. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4°C für 20 min. Der Überstand wurde verworfen und das transparente Pellet mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen, erneut bei 14000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in dH₂O gelöst.

2.2.1.12. *In vitro* Transkription von *Secp43*

Zuvor amplifiziertes und Phenol-Chloroform-extrahiertes *Secp43* wurde als Template für die folgende *in vitro* Translation mit einer T7-RNA-Polymerase verwendet und *in vitro* transkribiert. Der Transkriptionsansatz (Tab. 2-15) wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Template durch Zugabe von 1 µl DNase für weitere 30 min bei 37°C verdaut. Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop 1000 bestimmt und der Transkriptionsansatz bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Tabelle 2-15: Transkriptionsansatz

Komponente	Volumen
10x Transkriptionspuffer	3 µl
10 mM NTP Mix	1,5 µl
1 µg <i>Secp43</i> PCR-Produkt	1 µl
RiboBlock RNase Inhibitor 40U/µl	0,5 µl
T7 RNA-Polymerase 50 U/µl	1 µl
dH ₂ O	23 µl

2.2.1.13. *In vitro* Translation von *SECp43*

Zur Synthese von *SECp43* für weiterführende Experimente, wurde neben der rekombinanten Proteinexpression (siehe 2.2.3.8), die *in vitro* Translation (IVT), mithilfe des Rabbit Reticulocyte Lysate System angewendet. Hierbei enthält das

Retikulozytenlysat alle wichtigen Zellkomponenten, die für eine Proteinsynthese notwendig sind (tRNA, Ribosomen, Aminosäuren, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren). Mithilfe des Kits kann das zu translatierende Protein durch Zugabe von [^{35}S]Methionin radioaktiv markiert werden oder alternativ unmarkiert translatiert werden, wie in dieser Arbeit. Zuvor *in vitro* transkribierte *Secp43*-mRNA (siehe 2.2.1.12) wurde in einem Reaktionsansatz (Tab. 2-16) mit dem Rabbit Reticulocyte Lysate entsprechend der Herstellerangaben bei 30°C für 90 min inkubiert und anschließend bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert. Der Translationsansatz wurde im Western Blot getestet. Für den weiterführenden REMSA wurde der einzusetzende Ansatz zur Beseitigung der Template-mRNA mit 0,5 µl RNase A (Quiagen) für 15 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit DEPC-H₂O (0,01 - 0,1 %) abgestoppt.

Tabelle 2-16: Reaktionsansatz der *in vitro* Translation

Komponente	Volumen
Rabbit Reticulocyte Lysate	35 µl
0,5 mM Aminosäure-Mix (-Leu)	0,5 µl
0,5 mM Aminosäure-Mix (-Met)	0,5 µl
RiboBlock RNase Inhibitor 40U/µl	1 µl
3 µg <i>Secp43</i> -mRNA (Transkriptionsansatz)	3,2 µl
dH ₂ O	9,8 µl

2.2.1.14. RNA electrophoretic mobility shift assay (REMSA)

Um Interaktionen zwischen bestimmten Proteinen und RNA-Molekülen nachzuweisen, wurden *RNA electrophoretic mobility shift assays* (REMSA) durchgeführt. Der Assay beruht auf dem veränderten Wanderungsverhalten, abhängig von Ladung, Konformation und Größe eines Proteinligandenkomplexes im Vergleich zu den ungebundenen Komponenten nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel, unter nativen Konditionen (Gagnon und Maxwell 2011). In dieser Arbeit wurden die Interaktionen von *SECp43* mit der tRNA^{Sec} und mit seiner eigenen mRNA sowie die Interaktion von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec} untersucht. Zuvor wurde der Assay mit Trit1 und tRNA^{Sec} ausgetestet und Trit1 als Positivkontrolle etabliert. Zur Visualisierung im Gel wurde einer der beiden Bindungspartner radioaktiv markiert. In dieser Arbeit wurden $^{32}\text{Phosphor(P)}$ -markierte tRNA^{Sec} und *Secp43*-mRNA verwendet. Diese wurden zuvor von Dr. Noelia

Fradejas-Villar unter Einbau von ^{32}P -markiertem ATP *in vitro* transkribiert, aufgereinigt und für den REMSA zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-17: Puffer-, Gelzusammensetzung und Reaktionsansätze für den REMSA

Puffer	Zusammensetzung	
10x Laufpuffer:	39 % (v/v) KH_2PO_4 (10x), 61 % (v/v) K_2HPO_4 (10x)	
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	Gebrauchslösung: 1:10-Verdünnung des 10x Laufpuffers in DEPC- H_2O	
10x Bindepuffer	50 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 30 % (v/v) Ficoll	
10x Probenpuffer	25 mM K_3PO_4 pH 7,0, 25 % (v/v) Saccharose, 0,1 mg/ml Bromphenolblau, 0,001 % (w/v) Xylen Cyanol	
Natives Polyacrylamidgel	8 % (19:1) – für 1 Gel	5 % (37,5:1)- für 1 Gel
28,6 % Acrylamid 19:1	1,4 ml (8 %)	
30 % Acrylamid 37,5:1		0,833 ml (5 %)
10x Kaliumphosphatpuffer	0,5 ml (1x)	0,5 ml (1x)
100 % Glycerin	0,1 ml (2 %)	0,1 ml (2 %)
30 % APS	13,33 (0,08 %)	13,33 (0,08 %)
Temed	5 μl (0,1 %)	5 μl (0,1 %)
d H_2O	ad 5 ml	ad 5 ml
Reaktionsansätze	Bsp. mit tRNA ^{Sec} (12 μl)	Bsp. mit mRNA ^{Secp43} (12 μl)
10x Bindepuffer	1,2 μl (1x)	1,2 μl (1x)
RNAse Inhibitor 40U/ μl	0,5 μl	0,5 μl
10x Proteaseinhibitor	1,2 μl (1x)	1,2 μl (1x)
^{32}P -markierte tRNA ^{Sec} :	1 μl	-
20000 cpm/ μl		
^{32}P -markierte mRNA ^{Secp43} :	-	1 μl
20000 cpm/ μl		
Protein	0 – 4 μg (versuchsabhängig)	0 – 4 μg (versuchsabhängig)
d H_2O (Nuklease frei)	ad 12 μl	ad 12 μl
Wurde eine Konkurrenz getestet, erfolgte die Zugabe von unmarkierter tRNA ^{Sec} zu dem jeweiligen Ansatz in bestimmter Menge (0 – 69 pmol).		

Zunächst wurden alle Komponenten eines Reaktionsansatzes (Tab. 2-17) mit einem Gesamtvolumen von 10 bis maximal 15 μl auf Eis zusammen pipettiert und anschließend bei 37°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 10x REMSA-Ladepuffer (Tab. 2-17) versetzt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Für die Bindungsstudie von Protein mit tRNA^{Sec} wurde ein 8%iges Gel mit einem Acrylamid-Bisacrylamid-Verhältnis von 19:1 verwendet. Für die Analyse von Protein mit mRNA^{SECp43} wurde ein 5%iges Gel mit einem Verhältnis von 37,5:1 verwendet. Die Proben wurden nun elektrophoretisch bei 60 - 70 V für ca. 3 h aufgetrennt, bis die Bromphenolblaulauffront das untere Viertel des Gels erreicht hatte. Danach erfolgte das Trocknen des Gels im Geltrockner bei 80°C für ca. 2 - 3 h. Das Gel war dabei auf zwei Nitrozellulosemembranen fixiert und mit

Zellophan umhüllt. Das getrocknete Gel wurde über Nacht mit einer Imaging-Platte exponiert und am folgenden Tag im Phosphorimager ausgelesen.

2.2.1.15. Isolation von Mitochondrien

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob RNMTL1 ins Mitochondrium transportiert wird bzw. dort lokalisiert ist, wurden Mitochondrien aus HepG2-Zellen nach Rodrigue-Way et al. (Rodrigue-Way *et al.* 2007), mit kleinen Modifikationen, isoliert. Dazu wurden HepG2-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale bis zu einer Konfluenz von 80 - 100 % kultiviert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl Mitochondrienisolationpuffer (Tab. 2-18) versetzt. Nun wurden die Zellen abgeschabt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch den Einsatz eines Glasmörser mit einem Glaspistell sowie Ultraschallbehandlung. Danach wurden die Zellen zur Trennung der Cytosolfraktion von den Zelltrümmern bei 1000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 12000 g für 15 min. Der Überstand mit cytosolischen Proteinen wurde abgenommen und das mit Mitochondrien angereicherte Pellet mit 100 µl Mitochondrienisolationpuffer resuspendiert. Beide Proben wurden bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Tabelle 2-18: Zusammensetzung des Mitochondrienisolationpuffer

Mitochondrienisolationpuffer:
10 mM Tris, 0,25 M Saccharose, 0,2 mM EDTA
frisch hinzu: 1x Proteinaseinhibitor complete free (Roche Diagnostik, Mannheim)

2.2.2. Probengewinnung und Probenaufbereitung

Die Versuchstiere wurden entsprechend ihres Alters nach Richtlinien des Tierschutzgesetzes getötet. Die Tötung aller Versuchstiere erfolgte im Alter von ca. 60 Tagen, um die gleichen Versuchsbedingungen einzuhalten. Die Tiere wurden über CO₂-Inhalation betäubt und anschließend exsanguiniert. Zur Analyse von Serumparametern wurde die Aorta bzw. der Herzbeutel geöffnet und das ausströmende Blut aus dem Thoraxraum gewonnen. Das Vollblut wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Extraktion des Serums für 10 min bei 10000 g

und 4°C zentrifugiert. Das separierte Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80°C gelagert.

Die zur Gewinnung von Proteinen und RNA nach der Tötung entnommenen Organe wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

Um aus den Organen Proteine und RNA zu extrahieren, musste aus den Organen Gewebepulver hergestellt werden. Dazu wurde je ein Organ zunächst grob zerkleinert, in dem man dieses in ein Stickstoff-vorgekühltes Aluminiumfolienstück einwickelte und dann zertrümmerte. Die Organstücke wurden anschließend in ein Stickstoff-vorgekühltes Teflongefäß mit Wolframkarbidkugel überführt und in einen Dismembrator fixiert. Dieser pulverisierte die Organstücke bei einer Frequenz von 2000 rpm für 60 s. Mittels eines vorgekühlten Spatels wurde das Gewebepulver in vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80°C gelagert. Alle benötigten Hilfsmittel wurden entweder in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis vorgekühlt.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

Die für diesen Teil der Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden, wie in der folgenden Tabelle erläutert, hergestellt.

Tabelle 2-19: verwendete Lösungen und Puffer

Lösung	Bestandteile
APS (10 %)	10 % (w/v) APS in dH ₂ O
Blockierungspuffer (5 %)	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-T
Bradford-Reagenz (5 x)	1:5 Verdünnung in Wasser
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 45 % dH ₂ O
Entfärbelösung	25 % Methanol, 7,5 % Essigsäure, 67,5 % dH ₂ O
Gellösung (20 %)	162,3 ml 30 % Acrylamid, 65 ml 2 % Bisacrylamid, ad 250 ml dH ₂ O
Homogenisationspuffer	250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA in dH ₂ O, pH 7,4
Laemmli-Probenpuffer (4 x)	200 mM Tris pH 6,8, 40 % Glycerin, 16 % SDS, 20 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau in dH ₂ O
Laufpuffer (1 x)	Verdünnung des 10x Laufpuffers in dH ₂ O
Laufpuffer (10 x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O
TBS-T (10 x)	25 mM Tris, 125 mM NaCl, 0,3 % (w/v) Tween-20
Ponceau-Rot	0,1 % Ponceau-Rot in 5 % Essigsäure
RIPA-Puffer	50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Desoxycholsäure, 0,1 % SDS, 2x Proteaseinhibitor Complete Mini, 1 mM DTT in H ₂ O
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O

Transferpuffer (1 x)	100 ml 10x Transferpuffer, 100 ml Methanol, ad 1 l dH ₂ O
Transferpuffer (10 x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris in dH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Waschpuffer (1 x TBS-T)	Verdünnung des 10 x TBS-T in dH ₂ O

2.2.3.1. Proteinextraktion aus Gewebeproben

Proteinextraktion mit Homogenisationspuffer

Zur Proteinextraktion aus Mausgewebeproben wurde eine Spatelspitze Gewebepulver in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 400 - 500 µl eiskaltem Homogenisationspuffer (Tab. 2-19) versetzt und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung der Proben mit dem Labsonic M bzw. Sonifier 250 bei einer Amplitude von 100 und einem Zyklus von 0,6 auf Eis. Das Lysat wurde in einigen Versuchen als Gesamtproteinlysate eingesetzt. Für die meisten Versuche wurde jedoch eine partielle Fraktionierung des Proteinlysats, durch Zentrifugation bei 13000 g und 4°C für 15 min, durchgeführt. Dadurch wurden Membranproteine im Pellet und lösliche Proteine im Überstand angereichert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit 200 µl Homogenisationspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall gelöst.

Bei den Proben, die zur Messung der Deiodase-Aktivität verwendet wurden, wurde dem Homogenisationspuffer zuvor 1 mM DTT frisch hinzugegeben.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch die Bradford-Methode (siehe Abschnitt 2.2.3.2.). Die Proben wurden aliquotiert und bis zum Gebrauch bei – 20°C gelagert.

Proteinextraktion aus Zellkulturen

Zur Proteinextraktion aus kultivierten HepG2-Zellen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Zellen wurden entweder mittels Trypsinierung (siehe 2.2.4.2) von der Zellkulturschale abgelöst oder direkt in Homogenisationspuffer geerntet, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und weiter verarbeitet wie oben. Trypsinierte Zellen wurden bei 1000 g und RT für 5 min zentrifugiert, die pelletierten Zellen mit kaltem PBS unter erneuter Zentrifugation gewaschen und mit Homogenisationspuffer resuspendiert.

Proteinextraktion mit RIPA-Puffer

Für einige Versuche wurde entsprechend der Literaturangaben die Proteinextraktion alternativ mit RIPA-Puffer (Tab. 2-19) durchgeführt. Es wurde eine Spatelspitze Gewebepulver in einem vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl RIPA-Puffer resuspendiert, wie oben beschrieben homogenisiert und bei 4°C und 12000 rpm für 10 min zentrifugiert. Es kam dabei jedoch nicht zu einer partiellen Auftrennung in Membran- und Cytosolfraktion wie mit dem Homogenisationspuffer. Der die gesamten Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Zellreste enthaltende Pellet wurde verworfen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay Kit (siehe Abschnitt 2.2.3.2) bestimmt. Zuletzt wurden die Proben aliquotiert und bis zum Gebrauch bei – 20°C gelagert.

2.2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Bradford-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fast aller Proben erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). Bei dieser Methode werden Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 komplexiert, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm führt. Dieses Absorptionsspektrum ist photometrisch messbar und proportional zum Proteingehalt der Probe. Dazu wurden 1000 µl 1:5 verdünntes Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate in eine Einwegküvette pipettiert, 1 µl Proteinprobe hinzugegeben, gut gemischt und 20 – 30 min bei RT inkubiert. Mithilfe eines mitgeführten bovinen IgG-Standards (Bio-Rad Laboratories, München) und einer Nullprobe konnte die Proteinkonzentration der Proben nach Messung in einem Biophotometer bestimmt werden.

Bio-Rad DC Protein Assay (Lowry-Methode)

Die Konzentration der mit RIPA-Puffer isolierten Proteine und der Proteinhomogenate einiger Experimente wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay bestimmt. Der Assay basiert auf der Lowry-Methode (Lowry *et al.* 1951). Dabei

reagieren die Proteine im ersten Schritt in alkalischer Lösung mit Kupfer unter blau-violetter Färbung. Im darauffolgenden Schritt kommt es zu einer Reduktion des Folin-Reagenz mit resultierendem intensiv-blauem Farbumschlag. Dazu wurden 5 µl je Proteinprobe in eine Mikrotiterplatte pipettiert, dann 25 µl alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung und zuletzt 200 µl Folin-Reagenz hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Eine BSA-Proteinstandardreihe und eine Nullprobe wurden zur Berechnung des Proteingehalts mitgeführt. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte am Plate Reader Genios bei einer Wellenlänge von 750 nm und die Auswertung mit der XFluor4-Software. War eine Probe zu stark konzentriert, musste diese mit entsprechendem Puffer verdünnt und erneut gemessen werden.

2.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel über ein elektrisches Feld nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970; Schagger und von Jagow 1987), um diese dann im gefärbten Polyacrylamidgel oder im Western Blot zu analysieren. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, dass sich an die Proteinstrukturen anlagert, diese denaturiert und den Proteinen eine nahezu konstante negative Ladung je Molekülgröße gibt, in dem es die Eigenladung der Proteine überdeckt. Somit ist die gleichmäßige Auftrennung gleichgroßer Proteine im elektrischen Feld gewährleistet. Das β -Mercaptoethanol im Laemmli-Probenpuffer (Tab. 2-19) spaltet Disulfidbrücken und löst somit Sekundär- und Tertiärstrukturen auf.

Die für die SDS-PAGE verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem Sammelgel, verantwortlich für die Fokussierung der Proteine und einem Trenngel, in dem die Auftrennung nach Größen stattfand. Die genaue Zusammensetzung sowie die eingesetzten Proteinmengen sind Tabelle 2-20 zu entnehmen. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden 4:1 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Zum Größenvergleich und zur Beobachtung des Wanderungsverlaufs der Proteine wurde ein Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, St.Leon-Rot) in einer separaten Tasche mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte je nach Anzahl und Volumen der Proben entweder im Mini-PROTEAN 3 Cell System oder im PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S

(doppeltes Volumen der Gelzusammensetzung in Tabelle 2-20) bei 80 V im Sammelgel und bei 120 V im Trenngel bis die erste Markerbande das untere Ende erreicht hat.

Tabelle 2-20: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels und Proteinmengen

	Trenngel (für 2 Gele)	Sammelgel (für 2 Gele)
dH ₂ O	1,25 ml	2 ml
Trennpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1 ml
Gellösung (20 %)	6,25 ml	1 ml
Temed	10 µl	4 µl
APS (10 %)	100 µl	40 µl
	Proteinmenge	
Mausgewebekomogenat	60 – 100 µg	
Zelllysate	40 – 100 µg	
Bakterienlysate	5 – 50 µg	
Rekombinantes Protein	4 – 20 µg	

2.2.3.4. Coomassie-Färbung

Um die aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE direkt im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurden diese mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für 30 min in der Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert. Dabei lagert sich der Coomassie-Farbstoff irreversibel an die Proteine an. Anschließend wurde das gefärbte Gel über Nacht in der Entfärbelösung geschwenkt, wodurch die proteinfreien Bereiche des Gels entfärbt und somit die spezifischen Proteinbanden sichtbar wurden. Die Gele konnten zur Aufbewahrung in Wasser gelagert oder in Zellophan-Folie eingeschweißt werden.

2.2.3.5. Western Blot

Der Western-Blot ist eine Methode zur spezifischen Detektion von auf eine Membran transferierten Proteinen mittels Antikörper (Towbin *et al.* 1989), daher auch Immunoblot genannt. Er wird im Folgenden in zwei Schritte unterteilt.

Transfer

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte durch die SDS-PAGE. Anschließend wurden diese nach dem Semi-Dry Verfahren über die Transferblotapparatur bei 25 V und 250 mA elektrophoretisch auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm, Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) transferiert. Zuvor wurde die Membran in Transferpuffer equilibriert. Durch reversibles Anfärben der Membran in Ponceau-Rot konnten die Proteine und somit die Qualität des Transfers sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran kurz in der Färbelösung geschwenkt und danach mit H₂O abgespült.

Immunodetektion

Mithilfe spezifischer Antikörper wurde die immunochemische Detektion durchgeführt. Die Membran wurde für 60 min bei RT in Blockierungspuffer inkubiert, um die freien unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, verdünnt in Blockierungspuffer, bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal für 5 min bei RT mit Waschpuffer (TBS-T) gewaschen und dann für 60 min bei RT mit dem Sekundärantikörper, verdünnt in Blockierungspuffer, behandelt. Daraufhin wurde die Membran drei Mal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgte über die ECL (*enhanced chemilumineszenz*)-Methode. Die Membran wurde für 1 min in ECL-Reagenz bei RT geschwenkt und dann mit einem Chemilumineszenz-Film (Hyperfilm ECL; Amersham Bioscience, Freiburg) in einer Röntgenfilmkassette für die entsprechende Dauer exponiert. Nach der Filmentwicklung wurde der Film zur digitalen Weiterverarbeitung eingescannt.

2.2.3.6. Enzym-Aktivitätsassays

Dejodase-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der 5'-Dejodasen wurde ein radioaktiver Dejodase-Assay durchgeführt. Bei diesem wird das, nach Abspaltung von einem

radioaktiv-markierten rT3-Molekül (^{125}I -rT3), freigesetzte radioaktiv-markierte Jodidmolekül ($^{125}\text{I}^-$) gemessen. Es existieren drei verschiedene Dejodase-Isoformen, wobei die Dejodasen 1 und 2 die Außenringdejodierung (ARD) in 5'-Position des Phenolrings katalysieren (Maia *et al.* 2011; Williams und Bassett 2011). Um die 5'-Aktivitäten beider Dejodasen in diesem Assay unterscheiden zu können, wird ein spezifischer Dejodase-1-Inhibitor, Propylthiouracil (PTU), verwendet, wodurch über Differenzmessung nach einem Parallelansatz die spezifischen Dejodase-Aktivitäten ermittelt werden können. Da in den zu untersuchenden Proben dieser Arbeit keine Dejodase 2 exprimiert ist, war die gemessene Aktivität in diesem Assay nur auf die Dejodase 1 zurückzuführen.

Die zu messenden Proben wurden entsprechend Abschnitt 2.2.3.1 aufbereitet. Die eingesetzten Proteinmengen, immer in einem Ansatz von 40 μl Homogenisationspuffer mit 1 mM DTT pro Probe, ebenso wie die optimierte gewebeabhängigen rT3-Konzentrationen sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-21: Proteinmenge und rT3-Konzentration

Gewebe	Proteinmenge	C(rT3) in nMol
Mausleber	4 μg	0,03
Zelllysate	15 μg	0,0004

Traceraufreinigung:

Es wurden 600 μl Sephadex LH-20 in eine Sarpette gefüllt, die mit einem Filter (Porengröße: 10 μM , MoBiTec, Göttingen) abgedichtet war. Diese konnte somit als Chromatographie-Säule zur Aufreinigung verwendet werden. Die Säule wurde zuerst mit 3 ml 0,1 N HCl equilibriert, gefolgt von der Zugabe des Tracers und dem Waschen der Säule mit 3 ml 0,1 N HCl und 3 ml H_2O . Die Tracermenge wurde wie folgt berechnet: 0,29 - 0,40 μl ^{125}I -rT3 (12,4 MBq/ml; spezifische Aktivität von 58,1 MBq/ μg) pro Reaktion. Die Elution des Tracers erfolgte in 1 ml Ethanol: NH_3 (Verhältnis 49:1). Mithilfe von Stickstoff wurde das Eluat nun im Wasserbad bei 80°C eingedampft und anschließend mit Substratmix entsprechend Tabelle 2-22 versetzt und resuspendiert. Dabei sollte die gewünschte Aktivität 30000 – 80000 cpm pro 50 μl betragen.

Tabelle 2-22: Substratmixzusammensetzung

Komponente	Volumen
KPO ₄ -Puffer (pH 6,8)	10 µl
1 M DTT	2 µl
40 mM NaOH	0,41 µl
rT3	Mausleber: 0,1 µl 0,3 mM, Zelllysate: 0,1 µl 4 µM
dH ₂ O	Ad 50 µl

Assay:

Alle in diesem Assay verwendeten Puffer sind in Tabelle 2-23 dargestellt. Es wurden jeweils 4 Proben gemessen, wobei 3 ohne und eine mit PTU versetzt war. So wurden jeweils von 4 x 40 µl Proteinproben zu 3 Proteinproben 10 µl dH₂O und zu einer 10 µl PTU (10 mM) hinzugegeben. Diese mit PTU versetzte Probe diente als Kontrolle. Anschließend wurden 50 µl Substratmix/Tracer-Gemisch zu den Proteinproben pipettiert und diese dann bei 37°C für 60 min im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl BSA-Stopplösung auf Eis wurde die Reaktion beendet. Es erfolgte eine Fällung der Proteine mit 400 µl eiskalter 10%iger Trichloressigsäure und Zentrifugation für 5 min bei 14000 g und 4°C. 480 µl des resultierenden Überstandes wurden nun auf Dowex-50W-X2-Säulen gegeben woraufhin aus diesen das freigesetzte ¹²⁵I- mit 10%iger Essigsäure eluiert wurde.

Tabelle 2-23: Puffer und Lösungen für den Dejodase-Assay

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
BSA-Stopplösung	10 % (w/v) BSA, 10 mM PTU-Stammlösung, ad 10 ml dH ₂ O
Dowex-50W-X2	60 % (w/v) Dowex wurde in 10%iger (v/v) CH ₃ COOH gelöst und in mit Filtern abgedichtete Sarpettenspitzen gefüllt
Elutionslösung	98 % (v/v) Ethanol, 2 % (v/v) NH ₄ OH
KPO ₄ -Puffer	1 M K ₂ HPO ₄ , 10 mM EDTA, pH 9,4 mit NaOH (Puffer A); 1 M KH ₂ PO ₄ , 10 mM EDTA, pH 4,4 mit HCl (Puffer B) Puffer A wurde vorgelegt, um dann durch Titration mit Puffer B pH 6,8 zu erreichen
PTU-Stammlösung	50 mM PTU in 40 mM NaOH suspendiert und mit weiterer Zugabe von 0,1 M NaOH gelöst, pH ≤ 9,0; Verdünnungen in 40 mM NaOH
rT3 -Stammlösung	10 mM rT3 in 40 mM NaOH. 1 mM Gebrauchslösung in 40 mM NaOH
Sephadex LH-20	20 % (w/v) Sephadex LH-20 in 100 ml 0,1 N HCl

In einem Gammacounter wurde dann die Radioaktivität ermittelt. Zusätzlich wurden Kontrollen mitgeführt, in denen zunächst nur 10 µl dH₂O enthalten war und erst nach Zugabe der BSA-Stopplösung jeweils die 40 µl Proteinprobe hinzugegeben wurde.

Diese Kontrollen zeigten die Hintergrundaktivität des Assays. Um die genau eingesetzte Proteinmenge zu ermitteln, wurde nach dem Assay erneut eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt.

Berechnung der Enzymaktivität in pmol/mg x min:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{2 \times n(\text{rT}_3 \text{ in nmol}) \times [\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Hintergrund)}] \times 1000}{\text{cpm (100\%)} \times m(\text{Protein in mg}) \times t(\text{in min}) \times 480/550}$$

cpm = *counts* pro Minute

cpm (100 %) = theoretisch 100%ige Dejodierung von ^{125}I -rT₃

cpm (Hintergrund) = ^{125}I - Freisetzung durch nicht-enzymatische Dejodierung

cpm (Probe) = ^{125}I -Freisetzung durch Dejodierung

m (Protein in m) = Proteinmenge in mg

n (rT₃) = Stoffmenge an nicht markiertem rT₃ in nmol

t = Reaktionszeit in min

480/550 = Menge des Überstands durch Gesamtvolumen

Faktor 2 = statistisch kommt es zur Abspaltung eines radioaktiven und eines nicht radioaktiven Jodids (aufgrund der 5'-Markierung des ^{125}I -rT₃ und freie Drehbarkeit des phenolischen Rings um die Diphenyletherbindung)

Glutathion-Peroxidase (GPX) Aktivitäts-Assay

Glutathion-Peroxidasen spielen eine bedeutende Rolle bei der Protektion einer Zelle vor oxidativem Stress. Sie katalysieren die Glutathion(GSH)-abhängige Reduktion schädlicher Peroxide (RO-OH) in oxidiertes Glutathion (GS-SG) und Alkohole (ROH) (1). Das Produkt GS-SG wird unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Glutathionreduktasen (GR) (2).



Die Aktivitäten der Glutathion-Peroxidase 1 und 3 (cytosolische GPX, Plasma-GPX) u.a. in Zelllysaten oder Serumproben können in einem *in vitro* Assay gemessen werden (Flohe und Gunzler 1984). Die Aktivität der Enzyme wird indirekt über die Bestimmung des Abfalls der NADPH/H⁺-Konzentration bei 340 nm im

Spektralphotometer gemessen. Bei den, in dieser Arbeit untersuchten, Proteinlysaten aus Mauslebergewebe wurde nur die cGPX-Aktivität ermittelt.

Tabelle 2-24: Reaktionsmix und Versuchsansätze

Reaktionsmix		Versuchsansatz	2x	1x
Komponente	Endkonzentration	Komponente	Ungehemmt	gehemmt
dH ₂ O		Reaktionsmix	500 µl	500 µl
20xTE	0,2 M Tris, 1 mM EDTA			
NADPH	0,33 mg/ml	Mercapto-Succinat	—	400 µl
GSH	1,42 mg/ml (= 4,6 mM)			
GR	2 U/ml	dH ₂ O	500 µl	100 µl

Es wurden je Probe 500 µl Reaktionsmix, 500 µl dH₂O und 5-10 µl Proteinlysate aus Mauslebergewebe in zwei Küvetten pipettiert und gemischt (Tab. 2-24). In einem dritten Ansatz erfolgte durch zusätzliche 100 µl Mercapto-Succinat eine Hemmung der cGPX, um einen unspezifischen NADPH-Umsatz zu umgehen, in dem dieser von der ungehemmten Messung subtrahiert wurde. 10 µl 0,07 % tertiär-Butylhydroperoxid wurden als Startreagenz verwendet. Die Messung des NADPH-Umsatzes erfolgte in einem Zeitraum von 3 min und sieben festgehaltenen Messpunkten. Während dieser Messung wurden keine höheren Extinktionsänderungen als 10 - 15 % von Beginn bis Ende der Reaktion toleriert.

Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die cGPX-Aktivität wie folgt ermittelt werden:

$$\frac{\text{GPX-Aktivität}}{[\text{nmol}/(\text{min} \times \text{mg})]} = \frac{\Delta E_{340} / \text{min} \times V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{6200 [\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \times d [\text{cm}] \times m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} = \frac{\Delta E_{340} \times [\text{mol}] \times 10^6}{\text{min} \times 6200 \times m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \times 2}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen (1 ml = 1 cm³)

ΔE_{340} : Extinktionsänderung pro min bei 340 nm

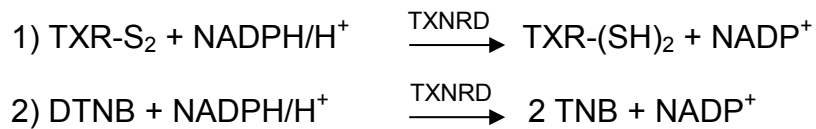
m_{Protein} : Protein im Ansatz in mg

d: Küvettendurchmesser (1 cm)

Thioredoxin-Reduktase (TXNRD) Aktivitäts-Assay

Ebenso wie die GPX gehören die Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD) zu den Selenoenzymen, die mit ihrer antioxidativen Wirkung zum Schutz der Zelle beitragen.

Unter Verbrauch von NADPH reduzieren die TXNRD Thioredoxin (TXR) *in vivo* (1). Zur Bestimmung der TXNRD-Aktivität kann diese in einem künstlichen System ermittelt werden, in dem 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) als Substrat verwendet wird. Dabei kommt es zu einer Reduktion von DTNB zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) (2).



Die TXNRD-Aktivität wurde in cytosolischen Proteinlysaten aus Mauslebergewebe bestimmt. Dazu wurden 900 µl Reaktionsmix (Tab. 2-25) und 100 µl Homogenisationspuffer (Tab. 2-19) miteinander versetzt und mit 5 - 25 µl 1:10 verdünntes Proteinlysate vermischt. Der Ansatz ohne Proteinlysate wurde als Referenz genommen. Der NADPH-Abfall wurde photometrisch bei 412 nm alle 10 s über einen Zeitraum von 1 min gemessen.

Tabelle 2-25: Zusammensetzung des Reaktionsmix

Reaktionsmix:
100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 mg/ml NADPH bzw. 0,2 mg/mL BSA in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mg/mL DTNB in 100 % EtOH

Durch folgende Berechnung konnte die TXNRD-Aktivität bestimmt werden:

$$\frac{\text{TXNRD-Aktivität}}{[\text{nmol}/(\text{min} \times \text{mg})]} = \frac{\Delta E_{412} / \text{min} \times V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{13600 [\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \times d [\text{cm}] \times m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \times 2} = \frac{\Delta E_{412} \times [\text{mol}] \times 10^6}{\text{min} \times 600 \times m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \times 2}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen (1 ml = 1 cm³)

ΔE_{412} : Extinktionsänderung pro min bei 412 nm

m_{Protein} : Protein im Ansatz in mg

d: Küvettdurchmesser (1 cm)

Faktor 2: stöchiometrisches Verhältnis der Umsetzung DTNB zu TNB

Transaminasenbestimmung im Serum

Um einen Leberschaden der untersuchten Mäuse auszuschließen wurden die Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (ASAT/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT/GPT) im Serum der Mäuse bestimmt, welche sich im Normalzustand innerhalb der Leberzelle befinden. Ein Transaminasenanstieg im Blutserum deutet somit auf eine Schädigung der Leberzellen hin. Beide Enzyme werden über einen gekoppelten enzymatischen Test indirekt nachgewiesen, bei dem die in der Transaminasenreaktion gebildete α -Ketosäure durch die Malatdehydrogenase (MDH) bzw. L-Lactatdehydrogenase (LDH) in Anwesenheit von NADH reduziert wird. Der Nachweis der gebildeten α -Ketosäuren erfolgt über folgende Indikatorreaktionen:



Für die Messung wurden 600 μl des jeweiligen Puffers (Tab. 2-26) mit 10 μl Serumprobe versetzt. Die Extinktionsabnahme des NADH wurde im Photometer Jenway 6300 mit der dazugehörigen Software 6₃-Zero bei 366 nm alle 10 s über einen Zeitraum von 3min gemessen. Dabei ist die Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit direkt proportional zur Aktivität der entsprechenden Transaminase in der Probe. Als Negativkontrolle diente der jeweilige Puffer ohne Hilfsenzym.

Tabelle 2-26: Puffer für die Messung von ASAT und ALAT

ASAT: Pufferzusammensetzung	ALAT: Pufferzusammensetzung
80 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	80 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
200 mM Aspartat	200 mM L-Alanin
14 mM alpha Ketoglutarat	14 mM alpha Ketoglutarat
0,21 mM NADH	0,21 mM NADH
Hilfsenzym immer frisch hinzu:	Hilfsenzym immer frisch hinzu:
0,6 U/ml MDH = 0,5 μl MDH/1 ml Puffer	1,2 U/ml LDH = 2 μl LDH/1 ml Puffer

Die Transaminasenaktivitäten wurden wie folgt berechnet:

$$\text{U/ml} = \frac{\Delta E_{366} / \text{min} \times V_{\text{Gesamt}}}{\epsilon \text{ (l/mol} \times \text{cm)} \times V_{\text{Serum}}} \quad \text{Normalwert} \leq 50 \text{ U/l} = 0,05 \text{ U/ml}$$

V_{Gesamt} : Gesamtansatzvolumen (610 μl)

V_{Serum} : Serumvolumen (10 μl)

$E = \epsilon_{366} \times d(\text{Küvettdicke} = 1 \text{ cm}) \times c(\text{Pufferkonzentration} = 200 \text{ mM}) = \text{Lamber-Beer'sches Gesetz}$

ϵ_{366} : Extinktionskoeffizient = 3.300

$\Delta E_{366}/\text{min}$: Extinktionsänderung/min bei 366 nm (aus Steigung des linearen Teils der Kurve bestimmt)

2.2.3.7. Rekombinante Proteinexpression und -aufreinigung

Rekombinante Proteinexpression

Alle zu exprimierenden Konstrukte wurden zuvor in den pET-52b(+)-Expressionsvektor kloniert (siehe 2.2.1.10) und anschließend in den One Shot BL21 Star (DE3) Chemically competent *E.coli* Bakterienstamm transformiert (siehe 2.2.1.6). Zuerst wurde eine Testexpression und -aufreinigung in kleinem Maßstab im Batch-Verfahren durchgeführt, um die optimalen Expressionsbedingungen zu ermitteln (Daten nicht gezeigt). Für die Expression im großen Maßstab wurde eine Starterkultur von 3 ml LB-Medium und 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin angesetzt, die mit einer BL21 Bakterienkolonie angeimpft wurde. Diese wurde zuvor frisch mit dem entsprechenden Plasmidkonstrukt retransformiert. Die Starterkultur wurde über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurden 3 l Hauptkultur (LB-Medium + 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp) mit 3 ml Starterkultur inokuliert und bei 37°C und 230 rpm solange inkubiert bis eine gemessene OD_{600} der Bakterien von 0,6 – 0,8 erreicht wurde. Nun erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG (Isopropylthiogalaktopyranosid) und eine weitere Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C und 230 rpm über Nacht. Vor Induktion wurden 14 ml Probe als Nichtinduktionskontrolle entnommen. Diese wurden bei 11000 g und RT für 2 min zentrifugiert und das Bakterienzellpellet bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch weggefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte und Lyse der Zellen.

Lyse und Aufschluss der Bakterienzellen

Die Bakterien wurden bei 5000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die OD_{600} der Bakterien zum Erntezeitpunkt betrug über 1. Fortan erfolgten alle Schritte immer auf

Eis. Das gekühlte Bakterienzellpellet wurde mit 2,5 ml Lysepuffer (Tab. 2-27)/ 1 g Pellet resuspendiert. Das resultierende Lysat wurde zum Aufbrechen der Zellen 2 x bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Des Weiteren wurde das Lysat mit 1 mg/ml Lysozym behandelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat im Kühlraum mit 4 x 50 Schüssen Ultraschall behandelt und daraufhin bei 12000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das klare, überständige Lysat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kühl gelagert, das Zellpellet als eventuelle Kontrolle wurde bei -20°C weggefroren. Die am Tag zuvor entnommene Nichtinduktionskontrolle wurde in 600 µl Lysepuffer resuspendiert und in allen weiteren Schritten gleich behandelt wie das Lysat.

Proteinaufreinigung über Nickel-NTA-Chromatographie

Erste Aufreinigung und Konzentration:

Da alle zu exprimierenden Konstrukte aufgrund des pET-52b(+)-Expressionsvektors über einen C-terminalen 10 x His-Tag verfügen, das Nickel komplexieren kann und somit an einer Nickel-Nitrilotriessigsäure(Ni-NTA)-Agarose (Qiagen, Hilden) bindet, wurde das klare Lysat mit dem exprimierten Protein über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt. Eluiert wurde mithilfe von Imidazol, welches mit den His-getaggten Proteinen um deren Bindungsstelle kompetiert. Die Proteinaufreinigung erfolgte durchgehend im Kühlraum.

Zunächst wurden 4 ml (Erfahrungswert) Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit Lysepuffer kurz equilibriert, bei 1000 g und 4°C für 1min zentrifugiert und der Lysepuffer verworfen. Nun wurde zum Binden der His-getaggten Proteine an die Ni-NTA-Agarose das zuvor gewonnene klare Lysat hinzugegeben und für 1 h bei leichtem Schütteln inkubiert. Zuvor wurden 100 µl des klaren Lysats als Kontrolle entnommen. Daraufhin erfolgte die Überführung des Ni-NTA-Agarose-Lysat-Mix auf eine Chromatographiesäule (Amersham Biosciences, Freiburg). Bei einer Durchflussrate von ca. 1 ml/min, für alle Schritte konstant gehalten, wurde mithilfe einer angeschlossenen Pumpe (Carl Roth, Karlsruhe) die Säulenmatrix zuerst mit dem 15-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer 1 (Tab. 2-27) und darauffolgend mit dem 7,5-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer 2 (Tab. 2-27) gewaschen. Zuletzt erfolgte die Elution des His-getaggten Proteins von der Säulenmatrix mit dem 5-fachen Säulenvolumen an Elutionspuffer (Tab. 2-27), wobei

das Eluat ein weiteres Mal auf die Säule gegeben wurde, um eine höhere Elutionsrate zu erreichen.

Mithilfe von Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck Millipore, Darmstadt) wurde das Eluat auf ein geringeres Volumen konzentriert. Dafür wurde das Eluat in die Filter Unit gegeben und bei 5000 g und 4°C für 75 min zentrifugiert, so dass das verbliebene Eluat innerhalb der Filter Unit auf ein Endvolumen von ca. 650 µl aufkonzentriert wurde (genaues Protokoll siehe Herstellerangaben).

Bei allen Proben (Nichtinduktionskontrolle, klares Lysat, Lysatdurchfluss, Waschpufferdurchfluss 1 und 2, Ni-NTA-Agarose und konzentriertes Eluat) wurde nach der Chromatographie im NanoDrop 1000 die Proteinkonzentration bestimmt und diese danach im Coomassie-Gel (siehe 2.2.3.4) und im Western Blot (siehe 2.2.3.5) analysiert.

Zweite Aufreinigung und Konzentration:

Um ebenfalls eluierte, aber unerwünschte Proteine, überwiegend His-enthaltende *E.coli*-Proteine, so weit es geht aus dem Eluat zu beseitigen und somit eine bessere Aufreinigung zu erzielen wurde das konzentrierte Eluat erneut aufgereinigt. Hierzu wurde das Thermo Scientific Spin Column Kit (Rockford, USA) verwendet (genaues Protokoll siehe Herstellerangaben). Diese Aufreinigung erfolgte über einen Imidazolgradienten. Die dazu verwendeten Puffer sind Tabelle 2-27 zu entnehmen. Zu 550 µl des konzentrierten Eluats wurden 250 µl Lysepuffer ohne Imidazol hinzugegeben. Aufgeteilt auf zwei Spin Columns mit je 400 µl Ni-NTA-Agarose (Erfahrungswert), eingesetzt in 1,5 ml Reaktionsgefäße, wurden je 400 µl des Eluats zur Proteinbindung auf ein Spin Column gegeben und für 60 min unter mehrfachem Aufspülen und Wiederbeladen auf Eis inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren in der Tischzentrifuge wurde der Durchfluss als Kontrolle aufbewahrt und das Spin Column in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Alle folgenden Schritte wurden identisch durchgeführt. Zuerst wurden 400 µl des Elutionspuffers 1 mit der geringsten Imidazolkonzentration von 20 mM auf die Spin Columns gegeben, um anschließend mit den weiteren Elutionspuffer 2 bis 5 die Imidazolkonzentration schrittweise zu erhöhen. Der letzte Elutionspuffer 5 enthielt die höchste Imidazolkonzentration von 500 mM. Die Proben wurden nach der Aufreinigung im Coomassie-Gel (siehe 2.2.3.4) und im Western Blot (siehe 2.2.3.5) analysiert. Das Eluat mit der größten Menge an exprimiertem Protein und dem höchsten Reinheitsgrad wurde daraufhin

mithilfe von Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore, Darmstadt) aufkonzentriert. Das Eluat wurde in das Filter Device überführt und bei 7500 g und 4°C für 25 min zentrifugiert, so dass das Eluat auf ein Volumen von 20 bis 40 µl konzentriert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und das verbliebene Eluat durch invertieren des Filter Device und erneuter Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C für 2 min wiedergewonnen (genaues Protokoll siehe Herstellerangaben). Zuletzt erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung des konzentrierten Eluats.

Tabelle 2-27: Puffer und Lösungen für Proteinexpression und -aufreinigung

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Lysepuffer / Waschpuffer 1 / Elutionspuffer 1	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol frisch hinzu: 1x Proteinaseinhibitor complete free (Roche Diagnostik, Mannheim)
Waschpuffer 2 / Elutionspuffer 2	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 1 M NaCl, 60 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol
Elutionspuffer / Elutionspuffer 4	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 60 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol
Lysepuffer ohne Imidazol	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 1 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerol
Elutionspuffer 3	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 100 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol
Elutionspuffer 5	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 500 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol

2.2.4. Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Konzentration des Spurenelements Selen (Se) im Serum von Mäusen wurde die Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik (TRFA) angewandt. Die Messungen erfolgten dabei im Picofox S2 Spektrometer. Mittels dieser sensitiven Methode ist es möglich in Wasser und biologischen Proben/Flüssigkeiten (z.B. Urin, Blutserum, Zellüberstand) simultan Multielement-Mikroanalysen durchzuführen und somit schon geringe Mengen an Spurenelementen zu detektieren und quantifizieren (Stosnach 2005). Zur Quantifizierung wurde Gallium (Ga) (10 mg/L, TraceCERT, Fluka) als interner Standard bei jeder zu messenden Probe mitgeführt. Geringe Volumina an Proben sind ausreichend für die Analyse. So wurden 10 µl Serum bzw. Zellüberstand mit 10 µl Ga-Standard vermischt, das Gemisch auf zwei Quarzplättchen pipettiert (Doppelbestimmung) und bei RT eingetrocknet.

Die Messung im Spektrometer erfolgt über Röntgenstrahlung (Abb. 2-1). Dabei wird diese am Monochromator bei einer Reflektivität von 80 % abgeleitet, bestrahlt dann im flachen Winkel die auf dem Quarzplättchen eingetrocknete Probe (Totalreflektion)

und wird schließlich an der Strahlblende gestoppt. Die charakteristische Wellenlänge eines jeden Elements und dessen Fluoreszenzintensität, welche direkt proportional zu dessen Konzentration ist, werden dann von einem energiedispersiven Detektor gemessen und digitalisiert. Die Auswertung erfolgte über die zugehörige Software.

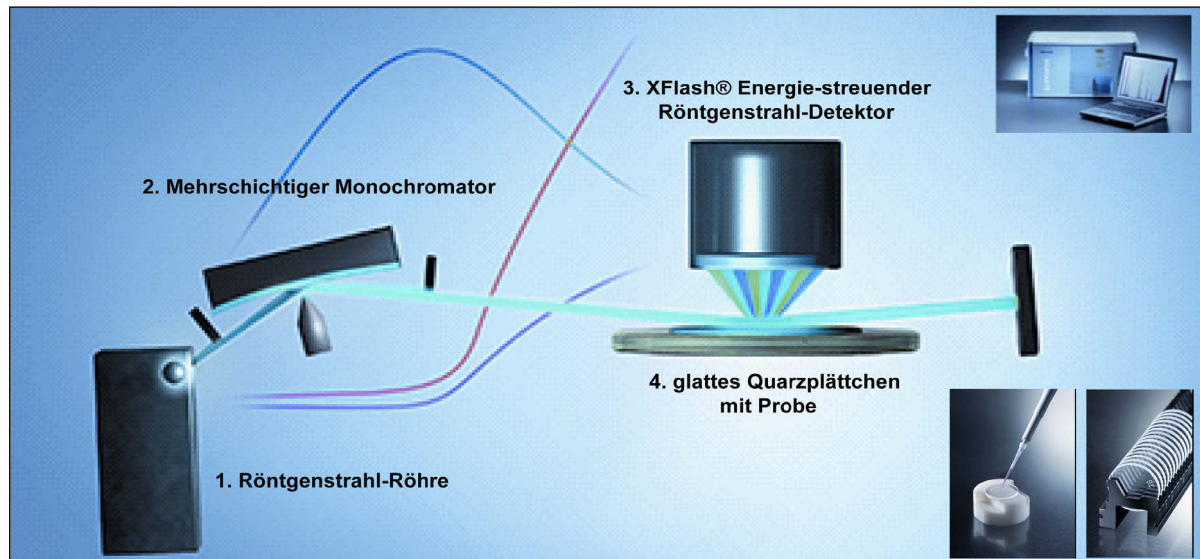


Abbildung 2-1: Aufbau und Funktionsweise des Picofox S2 Spektrometers. (siehe Text) (modifiziert nach (Stosnach 2005) und <http://www.bruker-axs.com>).

2.2.5. Zellkultur

2.2.5.1. Kultivierung

Eukaryontische Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 5 % CO₂-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % bei 37°C kultiviert. Alle verwendeten Materialien waren steril und es wurde immer unter einer Sterilbank gearbeitet, um Kontaminationen zu umgehen. Alle in der Zellkultur verwendeten Medien, Lösungen und Puffer wurden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die verwendeten Zelllinien sowie Medien und Lösungen sind den Tabellen 2-7 und 2-28 zu entnehmen.

2.2.5.2. Passagieren von eukaryontischen Zellen

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete HepG2-Zelllinie sowie die HEK 293T-Zelllinie wurden in einer T-75 Zellkulturflasche in dem entsprechenden Kultivierungsmedium (Tab. 2-28) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die adhärennten Zellen in einem gewünschten Verhältnis passagiert. Dazu wurde das Medium komplett abgenommen und die Zellen mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde 1,5 ml 1x Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin in 1x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) hinzugegeben und für ca. 10 min im Inkubator inkubiert, um die adhärennten Zellen in Suspension zu bringen. Danach wurde durch Zugabe von 8,5 ml Medium auf ein Endvolumen von 10 ml die Trypsinierung abgestoppt und dabei die restlichen Zellen vom Boden gespült. Je nach gewünschtem Verhältnis wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen verteilt und auf 14 ml Endvolumen mit Medium aufgefüllt bzw. die restlichen Zellen verworfen.

2.2.5.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die jeweiligen Zellen in einer T-75er Zellkulturflasche wie oben erläutert trypsiniert und ein Teil der Zellen 1:10 mit Medium verdünnt (100 μl Zellen + 900 μl Medium). Davon wurden 50 μl mit 50 μl Trypanblau versetzt, das zur Detektion toter Zellen dient. 10 μl des Gemischs wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl}/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.5.4. Stabile Transfektion von *RNMTL1*-Mutanten in HepG2-Zellen

Für die Transfektion von HepG2-Zellen mussten die Zellen zunächst gleichmäßig auf einer 6-*well*-Zellkulturplatte ausgesät werden. Dazu wurde die Zellzahl wie oben beschrieben bestimmt und $1,6 \times 10^6$ Zellen pro *well* ausgesät. Die Zellen wurden ÜN bis zu einer Konfluenz von ca. 70 – 80 % kultiviert, woraufhin die Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Life Technologies/Invitrogen, Darmstadt) im Anschluss nach

Herstellerangaben erfolgte. Dabei wurden je Transfektionansatz 8 µl Lipofectamine 2000 mit 250 µl 1x serum-reduzierten Opti-MEM I Medium (Life Technologies, Darmstadt) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Des Weiteren wurden 4 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA ebenfalls mit 250 µl 1x serum-reduzierten Opti-MEM I Medium versetzt. Nun wurde der Lipofectamine-Medium-Mix zu dem DNA-Medium-Mix gegeben, für 20 min bei RT inkubiert und der Ansatz anschließend auf ein *well* mit ausgesäten Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach ca. 12 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel (DMEM/F12 + 10 % FCS). Nach weiteren 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen über eine Verdünnungsreihe (1:4) auf mehrere *wells* aufgeteilt, um später die separierten, stabilen Klone besser picken zu können, und mit der Selektion mit G418 gestartet. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert, bei 1000 g und RT für 5 min zentrifugiert und das resultierende Zellpellet in 2 ml Selektionsmedium (Tab. 2-28) resuspendiert. 1 ml Zellsuspension wurde ebenso zentrifugiert, mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das resultierende Zellpellet für spätere Western Blot Analysen bei -20°C weggefroren. In einer neuen 6-*well*-Zellkulturplatte wurden je 3 ml Selektionsmedium pro *well* vorgelegt und die verbleibende 1 ml Zellsuspension mit dem Selektionsmedium des ersten *well*s vermischt. Davon wurden wiederum 1 ml mit dem Selektionsmedium des folgenden *well*s vermengt und der Vorgang bis zum letzten *well* wiederholt. Die verdünnten Zellen wurden nun ca. 4 Wochen kultiviert bis nur noch einzelne, runde Zellkolonien auf der Oberfläche zu sehen waren. Diese wurden in einer 48-*well*-Zellkulturplatte vereinzelt. Dafür wurden die Zellklone zuerst markiert und das Medium abgesaugt. Dann wurden 10-20 µl frisches Medium auf die Klone gegeben, diese mit einer gelben Pipettenspitze abgekratzt und aufgesaugt und in ein *well* überführt, in dem 200 µl Medium vorgelegt waren. Nachdem die separierten Klone kultiviert waren und eine Konfluenz von ca. 60 % erreicht hatten, wurden diese in eine 6-*well*-Platte umgesetzt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit 50 µl 1x Trypsin/EDTA trypsinisiert und auf zwei 6-*well*s mit je 2 ml vorgelegtem Medium gleichmäßig aufgeteilt. Dabei dienten nach der Ernte die Zellen des einen *well*s für die Gewinnung von Gesamtprotein zur Expressionsanalyse und die Zellen des zweiten *well*s zur Konservierung. Als Selektionskontrolle wurden immer HepG2 Wildtyp-Zellen mitgeführt, um zu ermitteln wann alle nicht-transfizierten Zellen abgestorben bzw. ausgesiekt waren.

2.2.5.5. Lentivirale Transduktion von *RNMTL1*-Mutanten in HepG2-Zellen

Eine Alternative zur gängigen Transfektion für die Einbringung von DNA bzw. eines Gens in eukaryontische Zellen stellt die Transduktion über ein Lentivirales System dar. Die DNA wird dabei direkt in das Genom der Zielzelle eingebaut. Dazu wurde zuerst die entsprechende DNA-Sequenz in einen lentiviralen Vektor (pCDH) kloniert (siehe 2.2.1.10). Zur Produktion von funktionellen Viruspartikeln für die Transduktion in HepG2-Zellen erfolgte eine Transfektion des lentiviralen Vektors mit speziellen Verpackungsplasmiden in HEK-293T-Zellen, welche die fehlenden Bestandteile zur Partikelbildung mit sich führten. Diese Zelllinie ist aufgrund des *large t-antigen* für SV40-Origin beinhaltende Vektoren gut geeignet und bevorzugt für die Virusproduktion. Es wurden ca. 7×10^6 HEK-293T Zellen in 10 ml DMEM + 10 % FCS ohne Antibiotika in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und für ca. 12 - 15 h bis zu einer Konfluenz von 50 - 80 % kultiviert. Nun wurden 17,6 µg pCDH-Expressionplasmid, 12,3 µg psPAX2-Verpackungsplasmid und pMD2.G-Hüllplasmid (beide Addgene, Cambridge, USA) mit 3,15 ml 1x serum-reduzierten Opti-MEM I Medium vermengt. Ebenfalls wurden 62,3 µl Lipofectamine 2000 mit 3,15 ml 1x serum-reduzierten Opti-MEM I Medium versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Ansätze miteinander vermischt, bei RT für 20 min inkubiert, anschließend vorsichtig auf die HEK-293T-Zellen gegeben und gemischt. Nach 12 - 15 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gegen frisches Kultivierungsmedium gewechselt. Nach 2 - 3 Tagen wurde das Medium abgenommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 1000 g und RT für 5 min zentrifugiert, um versehentlich mitgeführte und abgestorbene HEK-Zellen zu separieren. Das Medium mit den enthaltenen Viruspartikeln wurde nun zur Transduktion weiterverwendet und der Rest konserviert. Um die Infektionsrate zu erhöhen, wurden 10 µl Polybren, das die Ladungsabstoßung zwischen Virus und Zelloberfläche neutralisiert, zu 10 ml Virus-enhaltenem Medium zugesetzt. Einen Tag vor Transduktion wurde in einer 6-*well*-Zellkulturplatte $1,6 \times 10^6$ HepG2-Zellen je *well* ausgesät und am nächsten Tag mit 800 µl virushaltigem Medium transduziert. Die Zellen wurden nun kultiviert und alle 24 h das Medium gewechselt. Waren die Zellen konfluent, wurde mit der Puromycin-Selektion gestartet. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml 1 x PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin trypsinisiert. Durch Zugabe von 1,8 ml Selektionsmedium (Tab. 2-28) wurde die Reaktion gestoppt und die 2 ml

Zellsuspension in eine T-75er Zellkulturflasche mit 12 ml Selektionsmedium überführt. Die Zellen wurden für ca. 10 - 14 Tage selektiert und anschließend konserviert oder für folgende Experimente weiterverwendet.

2.2.5.6. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Um eukaryontische Zellen zu konservieren, wurden diese zunächst mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert und anschließend bei 1000 g und RT für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde nun in einem entsprechenden Volumen von Konservierungsmedium resuspendiert und jeweils 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden dann über Nacht bei -80°C langsam eingefroren, bevor sie im Stickstofftank (ARPEGE 140, Air Liquide) längerfristig konserviert wurden.

Zum Auftauen von eukaryontischen Zellen erfolgte eine kurze Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen gegeben, auf bis zu 10 ml mit Medium aufgefüllt und bei 1000 g und RT für 5 min zentrifugiert. Das überständige Medium wurde abgenommen, das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen vom Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale bzw. -flasche überführt und kultiviert.

2.2.5.7. Natriumselenitstimulation für den Dejodase-Assay

Bekanntlich steigert die Selensupplementation die Expression von stressbezogenen Selenoproteinen (Hatfield und Gladyshev 2002). Darum wurden die HepG2-Zellen für einen Dejodase-Assay (siehe 2.2.3.6) durch die Zugabe von 100 nM Natriumselenit zum Kultivierungsmedium (Tab. 2-28) für 2 Tage stimuliert. Die Expression der Dejodase konnte dadurch ca. um den Faktor 2 erhöht werden. Dadurch konnte eine maximale Dio1-Aktivität und somit eine höhere Sensitivität des Assays erreicht werden.

Tabelle 2-28: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Konservierungsmedium	DMEM/F-12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 1 % Penicillin (10 U/μl)/Streptomycin (10 μg/μl) + 10 % FCS + 10 % DMSO
Kultivierungsmedium für HEK 293T-Zelllinie	DMEM [mit L-Glutamin, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Natriumpyruvat] + 10 % FCS
Kultivierungsmedium für HepG2-Zelllinie	DMEM/F12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 1 % Penicillin(10 U/μl)/Streptomycin(10 μg/μl) + 10 % FCS
Selektionsmedium für transfizierte Zellen	DMEM/F12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 1 % Penicillin(10 U/μl)/Streptomycin(10 μg/μl) + 10 % FCS, + 1 % G418 (500 μg/ml)
Selektionsmedium für transduzierte Zellen	DMEM/F12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 1 % Penicillin(10 U/μl)/Streptomycin(10 μg/μl) + 10 % FCS, + 5 μg/ml Puromycin
Stimulierungsmedium mit Natriumselenit	DMEM [mit L-Glutamin, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Natriumpyruvat] + 10 % FCS, 100 nM Na ₂ SeO ₃

3. Ergebnisse

3.1. SECp43 und die Selenoproteinbiosynthese

3.1.1. Charakterisierung der *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäuse

3.1.1.1. Leberspezifische Inaktivierung von SECp43 bei Mäusen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde eine Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vivo* (Ding and Grabowski 1999) sowie *in vitro* im Komplex mit anderen Faktoren (Small-Howard et al. 2006) festgestellt. Weiterhin wurde eine Interaktion von SECp43 mit einem 48 kDa-Protein, heute bekannt als Sepsecs, beobachtet (Ding and Grabowski 1999). Zudem konnte von Xu Ming et al. eine Reduktion der 2'-O-methylierten tRNA^{Sec}-Isoform mcm5Um sowie eine Reduktion der Expression bestimmter Selenoproteine nach dem *knockdown* von *Secp43* in NIH3T3-Zellen beobachtet werden (Xu et al. 2005). Die genaue Funktion aber bleibt unbekannt, jedoch lassen diese Daten auf eine Rolle von SECp43 innerhalb der Selenoproteinbiosynthese schließen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Dolph Hatfield am National Institutes of Health (NIH) zwei Mausmutanten generiert. In einer Mausmutante wurden Exon 3 und 4 von SECp43 konstitutiv *in frame* deletiert, was jedoch weder Einfluss auf die Selenoproteinexpression noch auf die embryonale Entwicklung zeigte. In der zweiten Mausmutante wurde die konstitutive Inaktivierung von SECp43 durch eine *out of frame*-Deletion von Exon 7 und 8, und somit der Tyrosin(Tyr)-reichen Domäne, getestet, welche sich embryonal als letal erwies (Mahdi et al. 2015).

Zur weiteren Eingrenzung dieser Ergebnisse und da die Inaktivierung von tRNA^{Sec}-Gen (*Trsp*) (Bosl et al. 1997) oder *Secisbp2* (Seeher, Atassi, et al. 2014) aufgrund der gestörten Selenoproteinbiosynthese ebenfalls embryonal letal waren, wurde innerhalb dieser Arbeit eine konditionale Inaktivierung von SECp43 in der Mausleber untersucht. Die Leber wurde aufgrund ihrer Toleranz gegenüber Selenoproteinmangel gewählt. Da die Hepatozyten viele Selenoproteine exprimieren, stellt die Leber ein gutes Modell zur Analyse der Selenoproteinexpression dar

(Schweizer *et al.* 2005; Streckfuss *et al.* 2005). Zudem werden einige Selenoproteine wie Dio1 und Sepp ausschließlich in den Hepatozyten der Leber exprimiert.

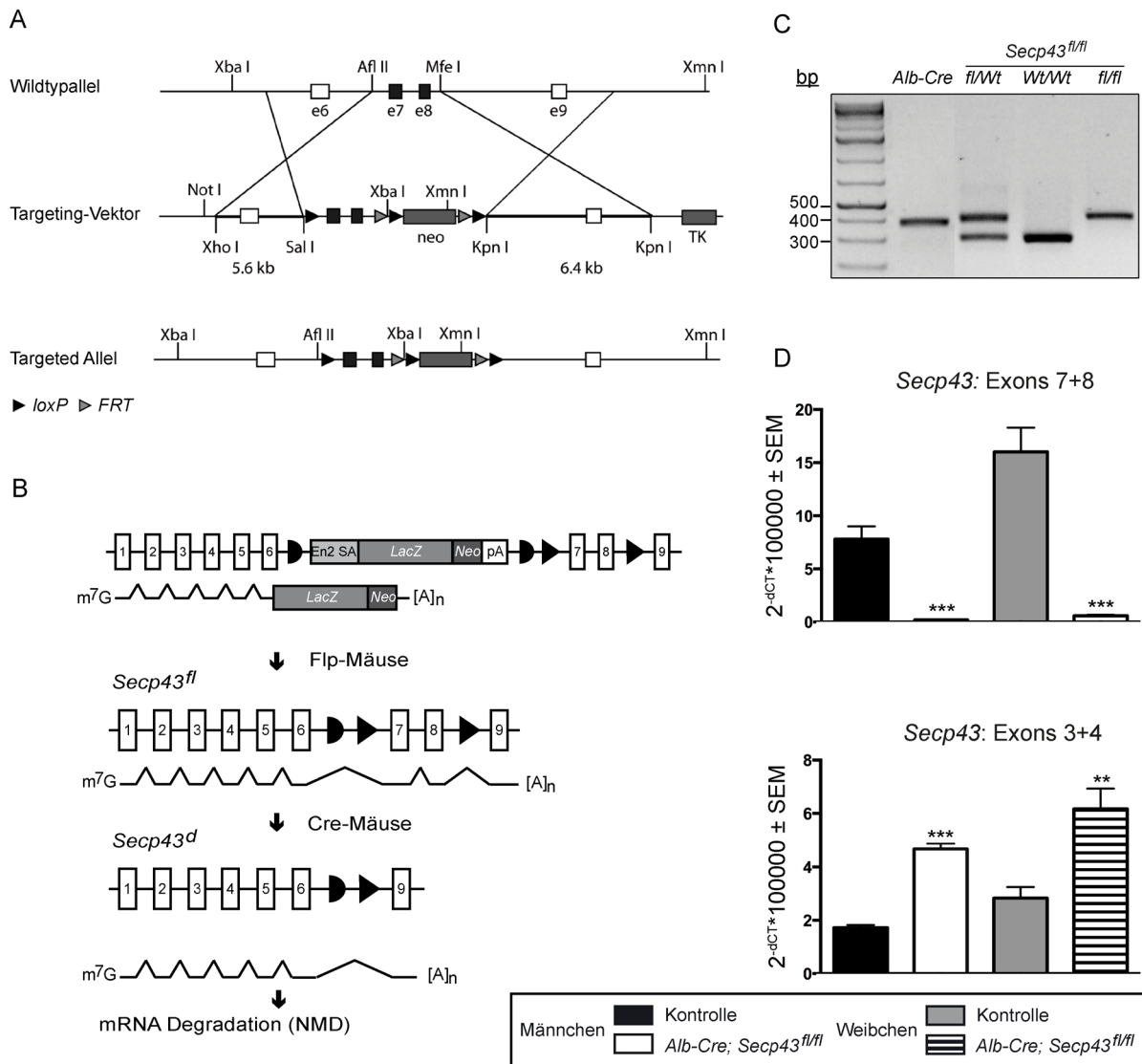


Abbildung 3-1: Leberspezifische Inaktivierung von Selp43 in Mäusen. (A) Vektor-Konstrukt und homologe Rekombination für die Insertion der *loxP*-Erkennungsstellen in *Selp43*, welche Exon 7(e7) und 8(e8) flankieren. (B) Schematische Darstellung der Generierung der konditionalen *Selp43*-knockout-Maus. Die Kästchen mit den Zahlen kennzeichnen die Exons. Neo = Neomycin, Flp = FLPe Rekombinase, NMD = Nonsense mediated decay. (C) PCR-Genotypisierung der *Alb-Cre* Mäuse (Produkt: 370 bp) und der *Selp43^{fl/fl}*-Mäuse (Wt = Wildtyp, Produkt: 310 bp; fl = *floxed*, Produkt: 410). (D) *Selp43* mRNA-Spiegel der Mausleber gemessen mittels qRT-PCR. Nahezu vollständige Deletion von Exon 7 und 8 in den *Alb-Cre; Selp43^{fl/fl}*-Mäusen (***P < 0,001). Die trunkierte mRNA, ermittelt mit Primer gegen Exon 3 und 4, ist hingegen hochreguliert (***P < 0,001; **P < 0,01). Studentischer t-Test. N = 4-7 pro Gruppe. Angeben sind die Mittelwerte ± SEM. Durchgeführt von Dr. med. dent. Paul Günter.

Die spezifische Inaktivierung in der Leber erfolgte mithilfe des *Cre/loxP*-Systems, wobei die zu deletierenden Exons 7 und 8, entsprechend des konstitutiven *knockouts*, mit *loxP*-Erkennungsstellen flankiert wurden. Diese wurden über das in Abbildung 3-1 A dargestellte Konstrukt eingefügt. Durch Verpaarung mit leberspezifischer Cre-Rekombinase transgenen Mäusen (*Alb-Cre*) wurden die Exons 7+8 im *Secp43*(fl) Locus von Hepatozyten *out of frame* deletiert. Somit konnte kein vollständiges Protein exprimiert werden. Eine schematische Übersicht über die Generierung der konditionalen KO-Mäuse ist in Abbildung 3-1 B dargestellt. Die leberspezifische Inaktivierung von SECp43 war im Gegensatz zum konstitutiven *knockout* nicht letal und hatte keine negativen Auswirkungen auf die Zucht oder das Verhalten der Tiere. Es wurden homozygote *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäuse entsprechend der Mendelschen Regeln gezüchtet und mittels PCR genotypisiert (Abb. 3-1 C).

Gewicht und Körpergröße unterschieden sich nicht zwischen *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*- und Kontrolltieren. Zunächst wurde die *Secp43*-Inaktivierung auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bestätigt. Die qRT-PCR für die deletierten Exons 7 und 8 zeigte signifikant erniedrigte *Secp43*-mRNA bei den KO-Tieren, während die qRT-PCR gegen Exon 3 und 4 sogar einen leicht erhöhten mRNA-Spiegel der KO-Tiere beider Geschlechter im Vergleich zu den Kontrolltieren offenbarte (Abb. 3-1 D). Diese Ergebnisse deuten auf eine Autoregulation mit der eigenen mRNA hin. Des Weiteren ist anzumerken, dass die mRNA-Spiegel der Weibchen höher als die der Männchen sind, was generell kein unbekanntes Phänomen ist (Schomburg *et al.* 2007).

Tabelle 3-1: Aktivitäten der Leber-Transaminasen im Mausserum. Es sind die Mittelwerte \pm SEM angegeben. Anzahl untersuchter Tiere: männliche Kontrolltiere (5), männliche KO-Tiere (4), weibliche Kontrolltiere (7) und weibliche KO-Tiere (6). Die Durchschnittswerte von Kontroll- zu KO-Tieren scheinen erhöht, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied (Studentscher t-Test). Zudem sind alle Durchschnittswerte mit ≤ 50 U/L im Normalbereich und die Leber somit intakt.

	Kontrollen	<i>Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}</i>
ASAT/GOT	15.5 \pm 9.1 U/L	22.6 \pm 10.6 U/L
ALAT/GPT	8.5 \pm 3.2 U/L	13.6 \pm 6.0 U/L

Um auszuschließen, dass die Leber der untersuchten Mäuse durch die Mutation geschädigt wurde und somit die Ergebnisse aller weiteren Analysen dadurch beeinträchtigen werden würden, wurden die Transaminasen als Schadensindikatoren im Serum der Mäuse gemessen. Zudem gibt die Konstitution der Leber einen ersten

Hinweis auf den Status der Selenoproteinexpression. Sowohl die Alanin-Aminotransferase (ALAT/GPT) als auch die Aspartat-Aminotransferase (ASAT/GOT) waren im Serum der Kontroll- und KO-Tiere mit ≤ 50 U/L im Normalbereich (Tab. 3-1), und die Leber somit intakt. Von Kontroll- zu KO-Tieren waren die Durchschnittswerte leicht erhöht, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied.

3.1.1.2. Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf Selenoprotein-mRNA in der Leber

Als erste Analyse, ob die Inaktivierung von *Secp43* einen Einfluss auf die Selenoproteinbiosynthese hat, wurden die Transkriptspiegel einiger, in der Leber exprimierter Selenoproteine, mithilfe der qRT-PCR von Dr. med. dent. Paul Günter im Zuge seiner medizinischen Doktorarbeit untersucht. Es konnte sowohl bei *Gpx1*, *Gpx4*, *Sepp*, *Dio1* als auch bei *Txnrd1* kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen mRNA-Spiegeln zwischen KO-Mäusen und Kontrolltieren beider Geschlechter festgestellt werden (Abb. 3-2).

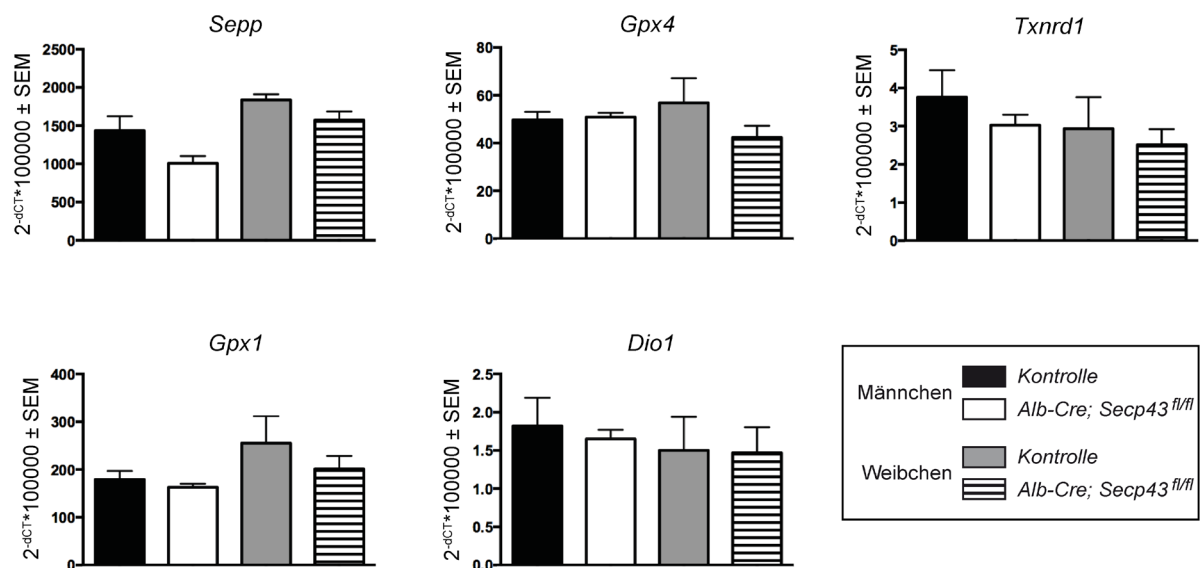


Abbildung 3-2: mRNA-Spiegel von Selenoproteinen in der Mausleber. Die mRNA-Spiegel wurden mit qRT-PCR ermittelt, wobei die 18S rRNA als Kontrolle diente. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Selenoproteinen zwischen Kontroll- und KO-Tieren gemessen werden. N = männliche Kontrolltiere (5), männliche KO-Tiere (4), weibliche Kontrolltiere (4 - 6) und weibliche KO-Tiere (7). Studentscher t-Test. Die Mittelwerte \pm SEM sind dargestellt. Durchgeführt von Dr. med. dent. Paul Günter.

3.1.1.3. Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf die Selenoproteinexpression der Leber

Untersuchung der Selenoproteinexpression in der Leber

Es erfolgte die Untersuchung der Selenoproteinexpression in der Leber. Proteinextrakt aus den Mausleberproben wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen Gpx1, Gpx4, Sepk, Seps und Sepp getestet (Abb. 3-3). Zudem wurde als Ladungskontrolle von allen Proben ein Western Blot gegen β -Aktin durchgeführt. Die Schwärzung aller Banden wurde quantifiziert, mit dem jeweiligen β -Aktin-Wert verrechnet und die Ergebnisse der KO- mit denen der Kontrolltiere verglichen (siehe Anhang). Auch hier war bei allen betrachteten Selenoproteinen kein signifikanter Unterschied zwischen KO-Mäusen und den Kontrolltieren beider Geschlechter zu erkennen. Die *Secp43*-Inaktivierung hat demzufolge keinen Einfluss auf die Selenoproteinexpression.

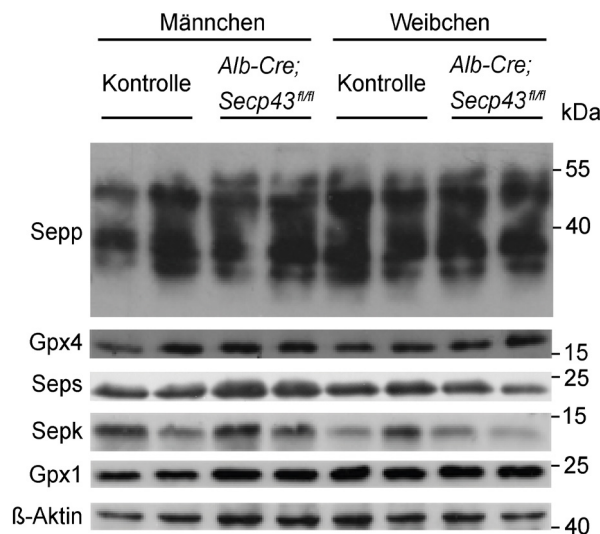


Abbildung 3-3: Selenoproteinexpression in der Leber der *Alb-Cre*, *Secp43^{fl/fl}*- und Kontrollmäuse. Die Selenoproteinspiegel von Sepp, Gpx4, Seps, Sepk und Gpx1 wurden mittels Western Blot ermittelt. Es ist jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den KO- und den Kontrolltieren sichtbar. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. Die Ergebnisse wurden bestätigt, indem die Banden zudem jeweils quantifiziert (ImageJ-Software), mit dem β -Aktin-Wert verrechnet und auf signifikante Unterschiede geprüft wurden (Studentscher t-Test; siehe Anhang).

Sepp- und Se-Status im Serum

Zusätzlich wurden die Sepp- und Se-Spiegel im Serum der Tiere gemessen, um die zuvor gewonnenen Erkenntnisse zu prüfen, dass der leberspezifische *Secp43* *knockout* keinen Einfluss auf die Selenoproteinexpression hat. Wie in der Einleitung erwähnt wird Sepp hauptsächlich in der Leber exprimiert und stellt den Hauptselenenträger im Plasma dar (Schweizer *et al.* 2005). Sepp im Serum wurde ebenfalls mittels Western Blot analysiert, wobei die Ponceau-Rot-Färbung als Ladungskontrolle und zur Quantifizierung diente. Der Se-Status hingegen wurde mittels TRFA bestimmt. Die Abbildung 3-4 zeigt, dass sowohl die Sepp- als auch die Se-Spiegel im Serum keine signifikanten Abweichungen zwischen den KO- und den Kontrolltieren beider Geschlechter aufweisen. Diese Erkenntnisse untermauern die vorherigen Ergebnisse der Leberproben.

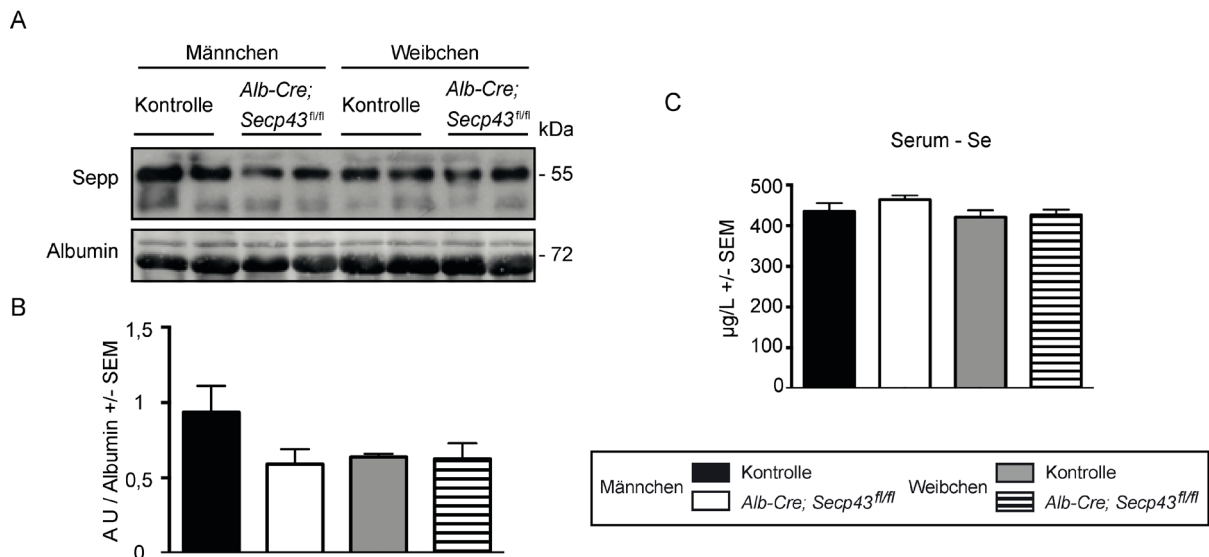


Abbildung 3-4: Sepp- und Se-Spiegel im Mausserum. (A) Sepp-Spiegel der Mausseren analysiert im Western Blot. Es wurden 12 μ l je Probe geladen. Die Ladungskontrolle wurde durch Ponceau S-Färbung ermittelt. (B) Quantifizierung der Banden des Sepp Western Blots relativ zur Beladungskontrolle Albumin, gefärbt mittels Ponceau S, quantifiziert mithilfe der ImageJ-Software. Studentscher t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (C) Selenstatus der Mausseren ermittelt durch TRFA. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen gemessen werden. Studentscher t-Test. N = männliche Kontrolltiere (5), männliche KO-Tiere (5), weibliche Kontrolltiere (7) und weibliche KO-Tiere (9). Die Mittelwerte \pm SEM sind angegeben.

3.1.1.4. Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf die Selenoenzymaktivität in der Leber

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Ausschalten von *Secp43* in der Leber einen Einfluss auf die Aktivitäten von Selenoproteinen bzw. Selenoenzymen hat. Die Aktivitäten von cytosolischem Txnrd, cytosolischem Gpx und Dio1 wurden in entsprechenden Assays bestimmt. Entsprechend aller vorherigen Ergebnisse war kein signifikanter Unterschied der KO- zu den Kontrolltieren zu erkennen (Abb. 3-5).

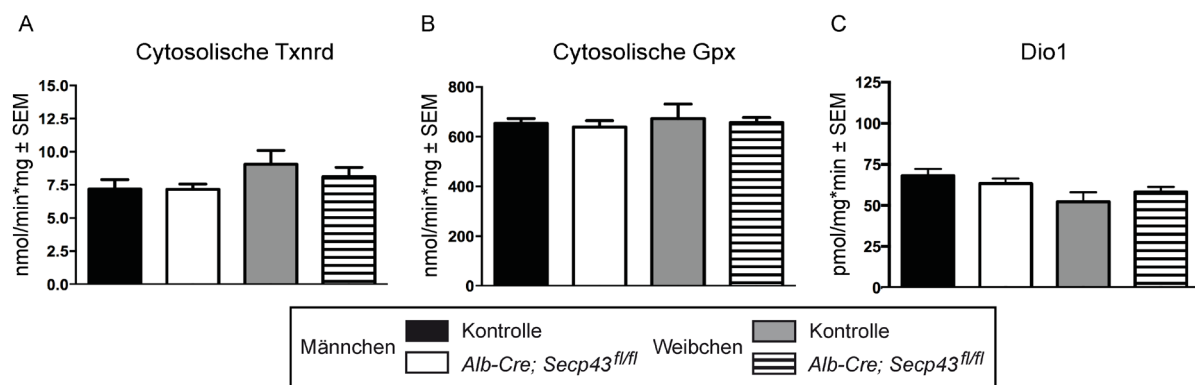


Abbildung 3-5: Selenoprotein-Aktivitäten in der Mausleber. (A) Cytosolische Txnrd-Aktivität. N = männliche Kontrolltiere (5), männliche KO-Tiere (4), weibliche Kontrolltiere (7) und weibliche KO-Tiere (6). (B) Cytosolische Gpx-Aktivität. N = männliche Kontrolltiere (4), männliche KO-Tiere (4), weibliche Kontrolltiere (6) und weibliche KO-Tiere (7). (C) Dio1-Aktivität. N = männliche Kontrolltiere (6), männliche KO-Tiere (7), weibliche Kontrolltiere (9) und weibliche KO-Tiere (12). Studentscher t-Test. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SEM angegeben. Genauere Angaben zu den Aktivitäts-Assays sind dem Material- und Methodenteil zu entnehmen.

3.1.1.5. Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf die Selenoproteinbiosynthesefaktoren

Die Inaktivierung von SECp43 könnte durch eine erhöhte Expression anderer Selenoproteinbiosynthesefaktoren kompensiert werden. Darum wurden mittels qRT-PCR die Transkriptspiegel der Selenoproteinbiosynthesefaktoren *Sephs2*, *Sepsecs*, *Serrs Tkv 1+2*, *Pstk* sowie *Secisbp2* und *eIF4a3*, welche beide als RNA-bindende Proteine und positive bzw. negative Regulatoren der Selenocystein-Insertion bekannt sind, untersucht. Durchgeführt von Dr. med. dent. Paul Günter im Zuge seiner medizinischen Doktorarbeit, brachte auch diese Analyse keine signifikanten

Unterschiede von KO- zu Kontrolltieren sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen hervor (Abb. 3-6 A). Es wurde beschrieben, dass Sepsecs mit SECp43 interagiert (Ding und Grabowski 1999; Xu *et al.* 2005). Daher wurde bei Sepsecs neben dem Transkriptspiegel auch die Expression mittels Western Blot näher betrachtet (Abb. 3-6 B+C), aber auch hier wurde das Ergebnis der entsprechenden qRT-PCR bestätigt. Es waren keine Unterschiede zwischen KO- zu Kontrolltieren zu erkennen.

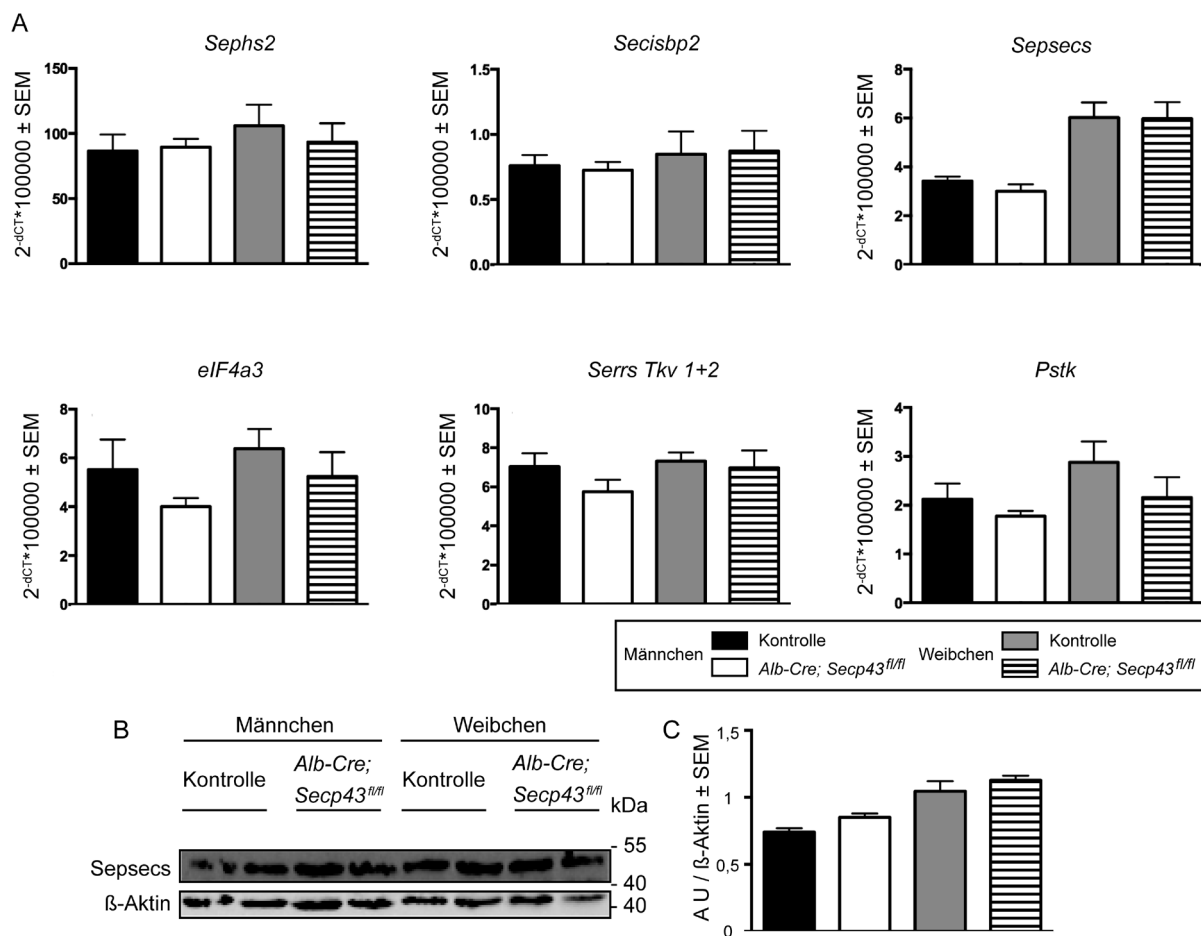


Abbildung 3-6: mRNA-Spiegel der Selenoproteinbiosynthesefaktor in der Mausleber. (A) Die durch qRT-PCR ermittelten mRNA-Spiegel (18S rRNA diente als Kontrolle) der Biosynthesefaktoren zeigten alle keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und KO-Tieren. N = männliche Kontrolltiere (5), männliche KO-Tiere (4), weibliche Kontrolltiere (4 - 6) und weibliche KO-Tiere (7). Studentscher t-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (B) Sepsecs Expressionslevel ermittelt durch Western Blot. Das Protein wurde bei ca. 48 kDa detektiert, jedoch ist kein Unterschied bei den KO-Tieren zu sehen. (C) Quantifizierung der Banden des Western Blots relativ zur Beladungskontrolle β -Aktin mithilfe der ImageJ-Software. Studentscher t-Test. Es sind die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Durchgeführt von Dr. med. dent. Paul Günter.

3.1.2. Interaktionsstudien mit SECp43

Ding und Grabowski zeigten das erste Mal die Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vivo*, jedoch mit rekombinantem SECp43 und *in vitro* transkribierter tRNA^{Sec} konnten sie diese Assoziation nicht reproduzieren (Ding und Grabowski 1999). Weiterführend wurde von Small-Howard et al. eine Interaktion von SECp43 und der tRNA^{Sec} in einem Komplex mit EfSec *in vitro* im *RNA electrophoretic mobility shift assay* (REMSA) nachgewiesen, eine direkte Bindung von SECp43 mit der tRNA^{Sec} allein hingegen nicht (Small-Howard et al. 2006). In beiden Publikationen wurden die Daten der erfolglosen direkten Interaktion zwischen SECp43 und der tRNA^{Sec} jeweils nicht gezeigt, sondern nur kurz erwähnt. Das warf Fragen auf und die Reproduktion dieser Daten war von Interesse. Des Weiteren sollte aufgrund der möglichen Autoregulation von SECp43 (siehe 3.1.1.1) die Bindung von SECp43 mit seiner eigenen mRNA analysiert werden. Es wurden rekombinantes SECp43, *in vitro* translatiertes SECp43, *in vitro* transkribierte, ³²P-radioaktiv markierte tRNA^{Sec} und mRNA^{Secp43} (beide durch Dr. Noelia Fradejas-Villar der Arbeitsgruppe) hergestellt und die Interaktionen im REMSA untersucht. Zudem sollte eine Positivkontrolle etabliert werden, wofür die bekannten Selenoproteinbiosynthesefaktoren, rekombinantes Pstk, Sepsecs und Trit1 verwendet wurden (her- und zur Verfügung gestellt durch unsere Kooperationsgruppe an den NIH sowie Dr. Noelia Fradejas-Villar).

3.1.2.1. Rekombinante Proteinexpression und –aufreinigung von SECp43

Zunächst wurde SECp43 rekombinant in dem *E.coli*-Stamm BL21 Star exprimiert und das gewonnene Protein mithilfe eines C-terminalen 10x His-Tags über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die entnommenen Proben der einzelnen Schritte wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl im Western Blot als auch im Coomassie-Gel analysiert (Abb. 3-7 A).

Es muss zuerst erwähnt werden, dass SECp43 in Form einer Doppelbande detektiert wurde. Dabei entspricht die obere Bande der zu erwartenden Größe des vollständigen Proteins von ca. 43 kDA, die untere Bande hingegen entspricht mit ca. 39 kDA einer trunkeerten Form. Der Western Blot zeigt wie vermutet, dass die Nicht-

Induktionskontrolle kein SECp43 beinhaltet, währenddessen das klare Lysat nach Induktion SECp43 aufweist. Sowohl im Western Blot als auch im Coomassie-Gel ist zu erkennen, dass in den Proben der Waschschritte 1+2 nur in sehr geringem Maße SECp43 detektiert wurde und dementsprechend wenig SECp43 durch die Waschschritte verloren ging.

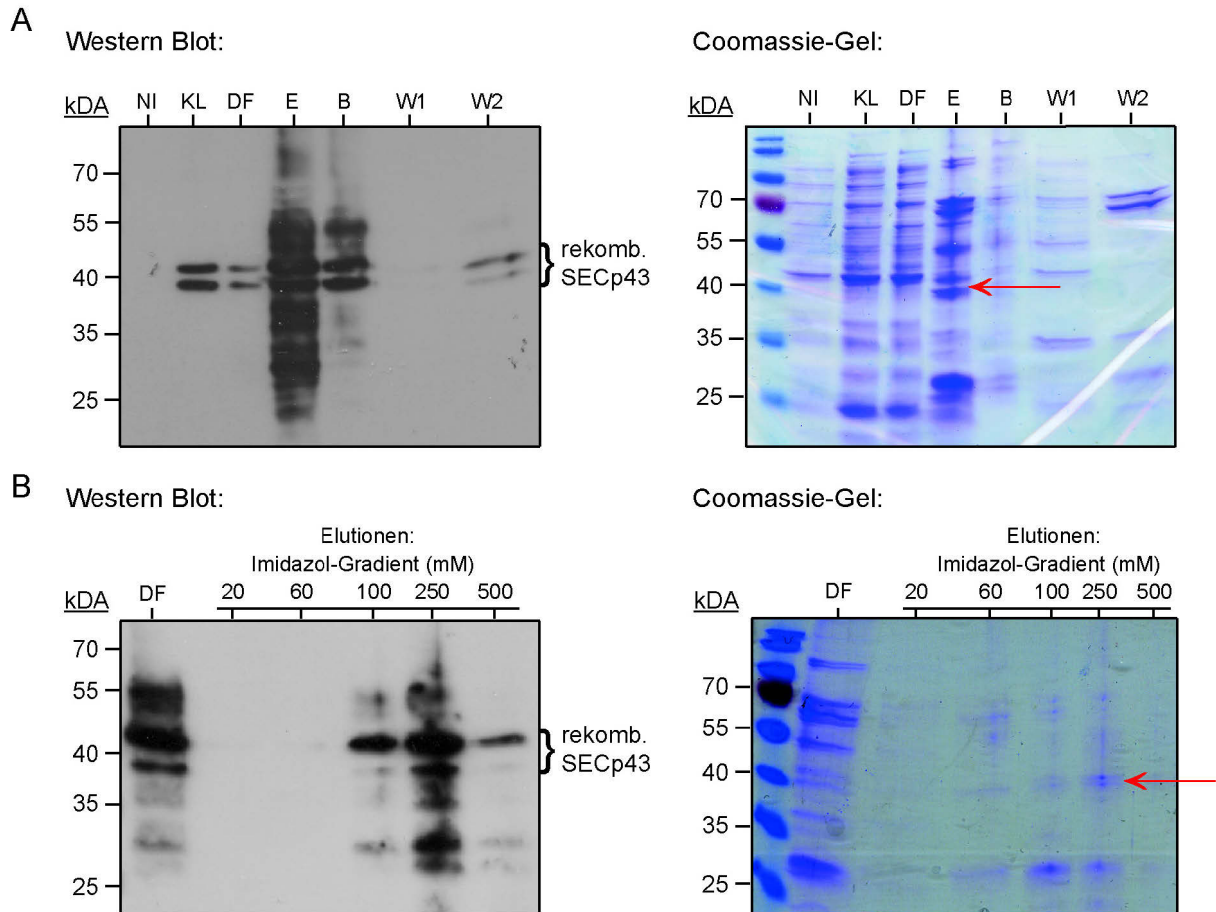


Abbildung 3-7: Aufreinigung von rekombinantem SECp43 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. (A) Analyse der Expression und ersten Aufreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographiesäule mittels Western Blot (Primärantikörper: Mouse- α -His) und Coomassie-Gel. Bei beiden Analysen wurde das gleiche Auftragsschema verwendet: Nicht-Induktionskontrolle (NI), Klares Lysat (KL), Durchfluss (DF), Eluat (E), Agarosebead-Kontrolle (B), Waschkontrolle 1 (W1) und Waschkontrolle 2 (W2). Sowohl im Western Blot als auch im Coomassie ist im Eluat neben Kontaminationen rekombinantes SECp34 in Form einer Doppelbande bei ca. 43 bzw 39 kDA detektierbar. (B) Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse der zweiten Aufreinigung mittels Elution über einen Imidazolgradienten in Ni-NTA-Spin Columns. In beiden Analysen, mit identischem Auftragsschema, ist in der Elutionsfraktion mit 250 mM Imidazol die höchste Ausbeute mit der höchsten Reinheit von SECp43, trotz weiterer Kontaminationen, sichtbar.

Außerdem zeigen beide Analysen, dass in dem Eluat SECp43 im Vergleich zu den anderen Proben am stärksten präsent ist, jedoch aufgrund vieler Kontaminationen in unreiner Form. Zudem wurde durch beide Analysen in der Ni-NTA-Agarosebead-Kontrolle SECp43 detektiert, was auf eine nicht vollständige Elution hindeutet.

Anschließend wurde die Elutionsfraktion aufkonzentriert und diese erneut in kleinerem Maßstab mithilfe von Spin Columns aufgereinigt, um den Reinheitsgrad des rekombinanten SECp43 zu erhöhen. Die Elution erfolgte durch eine schrittweise gesteigerte Imidazolkonzentration. Wie man in Abbildung 3-7 B im Western Blot sowie im Coomassie-Gel erkennen kann, zeigt die Elutionsfraktion mit 250 mM Imidazol die höchste Ausbeute an SECp43, mit entsprechend geringen Mengen an Kontaminationen, im Vergleich zur ersten Aufreinigung. Zudem wurde in dem Durchfluss deutlich SECp43 detektiert. Vermutlich hat SECp43 nicht komplett an die Ni-NTA-Agarose gebunden. Das aufgereinigte SECp43 der Elutionsfraktion bei 250 mM Imidazol wurde nun aufkonzentriert, die Proteinkonzentration bestimmt und in dem folgenden REMSA eingesetzt.

3.1.2.2. SECp43-Synthese mittels *in vitro* Translation

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der bakteriellen Expression wurde alternativ das SECp43 auch durch *in vitro* Translation synthetisiert. Mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde die Translationsreaktion überprüft (Abb. 3-8). Im Vergleich zur rekombinanten SECp43-Expression, liegt das SECp43 hier bei 43 kDa als vollständiges Protein in Form nur einer Bande vor.

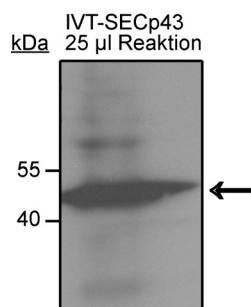


Abbildung 3-8: Western Blot-Analyse der *in vitro* Translation von SECp43. Aufgrund geringer Ausbeute wurde der Reaktionsansatz ohne eine folgende Aufreinigung direkt eingesetzt. Als Antikörper wurde Mouse- α -HIS eingesetzt. Es wurde eine starke dominante Bande des SECp43 bei ca. 43 kDa detektiert.

Dabei ist zu erwähnen, dass die Ausbeute mithilfe des Kits nur sehr gering ist und eine Aufreinigung darum nicht durchgeführt wurde. Das *in vitro* translatierte SECp43 wurde in dem Reaktionsmix direkt für die Bindungsanalysen eingesetzt.

3.1.2.3. Etablierung von Trit1 als Positivkontrolle für den REMSA

Für die Bindungsstudien von SECp43 musste zunächst die Methode und eine Positivkontrolle etabliert werden. Dazu wurden drei bekannte Selenoproteinbiosynthesefaktoren, rekombinantes Pstk, Sepsecs und Trit1 unter verschiedenen Konditionen jeweils mit der radioaktiv markierten tRNA^{Sec} im REMSA getestet. In Abbildung 3-9 A erkennt man bei der Probe mit Trit1 und tRNA^{Sec} drei verzögerte Banden im Vergleich zur Negativkontrolle (tRNA^{Sec} ohne Protein). Dabei ist die mittlere Bande am stärksten. Zudem sieht man in der Spur nur ein sehr schwaches Signal auf der Höhe der ungebundenen tRNA^{Sec} . Man muss von einer Interaktion von Trit1 zur tRNA^{Sec} zu einem RNA-Protein-Komplex ausgehen, der für alle weiteren Assays für Protein- tRNA^{Sec} -Bindungsstudien als Positivkontrolle verwendet wurde. Sowohl Pstk als auch Sepsecs zeigten, bis auf ein wenig Hintergrund, keinen veränderten Wanderungsverlauf zur Negativkontrolle.

Mit der gewonnenen Positivkontrolle wurde weiterführend eine Kompetitortitration durchgeführt, um eine unspezifische Bindung auszuschließen (Abb. 3-9 B). Man kann sehen, dass durch eine gesteigerte Zugabe von nicht-radioaktiv markierter tRNA^{Sec} als Kompetitor die Intensität der drei Banden des RNA-Protein-Komplexes dementsprechend abnimmt und parallel das Signal der freien tRNA^{Sec} zunimmt. Bemerkenswert dabei ist jedoch die anfängliche Zunahme der Intensität der untersten geshifteten Bande mit einhergehendem Verschwinden der mittleren Bande durch Zugabe von 2,16 bis 4,32 pmol kalter tRNA^{Sec} , um dann bei weiterer Kompetitorzugabe wieder abzunehmen. Diese Bande war interessanterweise bei der Positivkontrolle, versetzt mit 1 μg Gesamt-RNA zum Blockieren, die dominante Bande. Hier war die mittlere Bande nur sehr schwach detektiert und die oberste Bande nicht vorhanden. Zudem wurde in demselben Assay als Kontrolle eine Probe mitgeführt, in der Trit1 vor der Zugabe bei 95°C für 5 min aufgekocht wurde. Das Protein war dadurch denaturiert, konnte keine Bindung mit tRNA^{Sec} eingehen und zeigte das gleiche Muster wie die Negativkontrolle. Des Weiteren wurde auch Trit1 selber titriert (Abb. 3-9 C). Mit zunehmender Konzentration von Trit1, beginnend mit

0,59 pmol, bei gleichbleibender Menge an markierter $tRNA^{Sec}$, nehmen die Signale der RNA-Protein-Komplexe zu und parallel dazu nimmt die ungebundene $tRNA^{Sec}$ ab. Bemerkenswerterweise wird die mittlere Bande ab einer Trit1-Zugabe von 9,43 bis 18,87 pmol schwächer, einhergehend mit einer stärker sichtbaren obersten Bande. Der K_d -Wert (Dissoziationskonstante bzw. Gleichgewichtskonstante) von Trit1 liegt hier bei ca. 0,7 pmol, wenn man alle Signale der angenommenen $tRNA^{Sec}$ -Trit1-Komplexe addiert (GraphPad Prism: One Site – Specific binding). Dieser Wert ist die Proteinkonzentration, bei der die Dissoziationreaktion im Gleichgewicht ist und gibt somit Auskunft über die Affinität des Proteins zu seinem Bindungspartner.

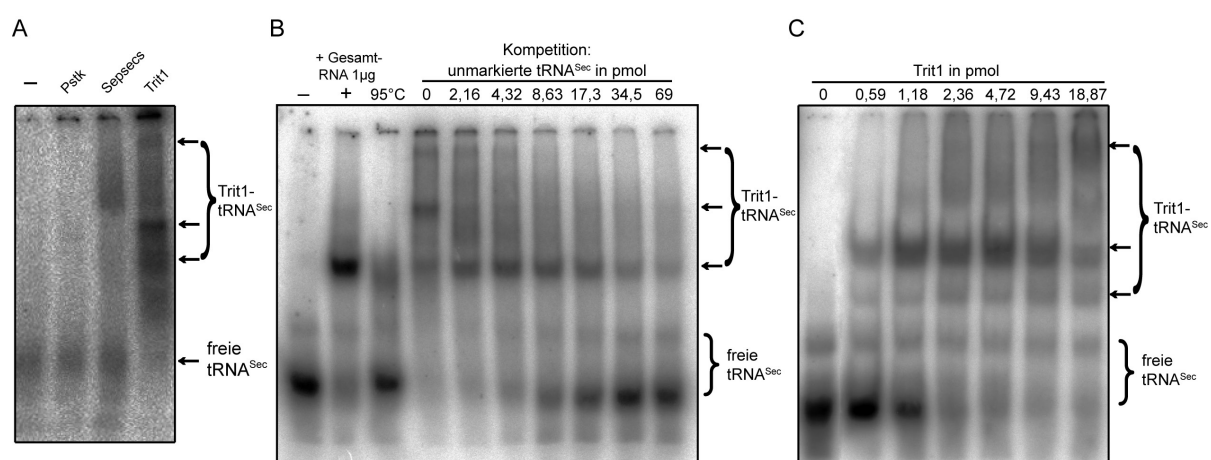


Abbildung 3-9: Trit1 interagiert mit $tRNA^{Sec}$ ermittelt im REMSA. Eine Probe ohne Protein diente jeweils als Negativkontrolle (-). **(A)** Erste Bindungsanalyse von Sepsecs, PstK und Trit1 jeweils mit der $tRNA^{Sec}$ als mögliche Positivkontrolle. In der Probe mit Trit1 sind drei geshiftete Banden zusehen. Reaktionsansatz: gelabelte $tRNA^{Sec}$ (10000 cpm), je Protein 1 μ g, 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor. **(B)** Konkurrenz der Bindung von Trit1 und gelabelter $tRNA^{Sec}$ durch Titration mit unmarkierter $tRNA^{Sec}$. Reaktionsansatz: gelabelte $tRNA^{Sec}$ (10000 cpm), Trit1 1 μ g (18,87 pmol), 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor, RNase-Inhibitor (20U), BSA (0,3 μ g/ μ l). **(C)** Trit1-Titration einhergehend mit der Intensitätsteigerung der geshifteten Banden und der Abnahme der ungebundenen $tRNA^{Sec}$. Reaktionsansatz: gelabelte $tRNA^{Sec}$ (20000 cpm), 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor, RNase-Inhibitor (20U).

3.1.2.4. Bindungsanalysen von SECp43

Bindungsanalyse von rekombinantem SECp43 mit $tRNA^{Sec}$

Da zuvor mit Trit1 eine Positivkontrolle etabliert wurde, konnte nun die Interaktion von SECp43 untersucht werden. In Abbildung 3-10 A sieht man in Spur 3 der Probe

mit rekombinantem SECp43 und tRNA^{Sec} im Vergleich zur Negativkontrolle eine erhöhte Bande und auch nur ein sehr schwaches Signal auf der Höhe der ungebundenen tRNA^{Sec}. Das lässt eine Bindung von SECp43 mit der tRNA^{Sec} vermuten. Daraufhin wurden verschiedene Reaktionsbedingungen und eine Konkurrenz mit nicht-radioaktiv markierter tRNA^{Sec} getestet sowie das Protein titriert (Abb. 3-10 B). Das Signal mit dem bisher verwendeten Bindepuffer ist deutlich besser als mit dem alternativen Bindepuffer D. Zudem wurde das Signal durch die Zugabe der unmarkierten tRNA^{Sec} nicht kompetiert, es ist kein Unterschied zu den Proben ohne unmarkierter tRNA^{Sec} zu erkennen. Eine mögliche unspezifische Bindung, welche zu dem Signal führen könnte, wäre anzunehmen. Weiterhin ist keine Intensitätssteigerung der Bande durch Zugabe höherer Proteinkonzentrationen zu erkennen, dass diese Aussage unterstreicht.

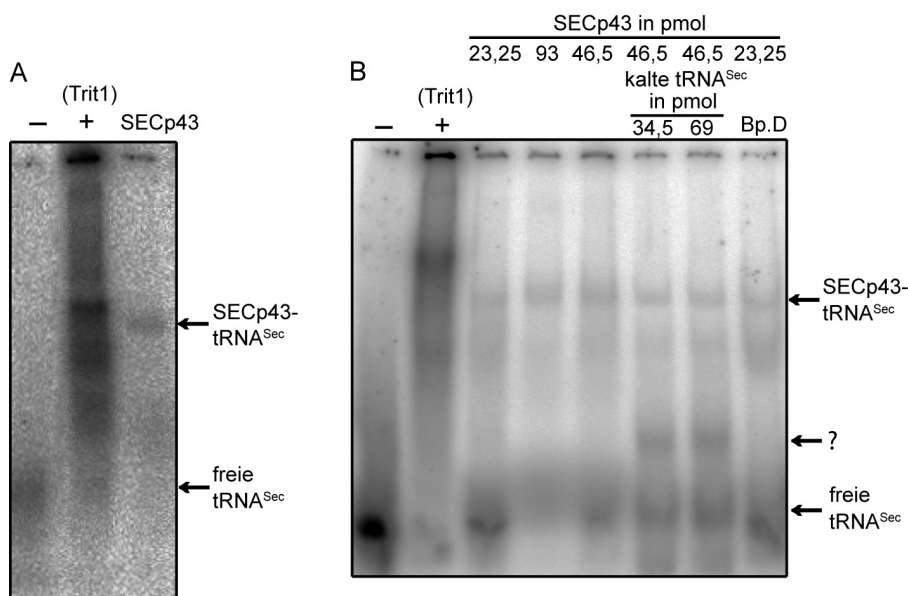


Abbildung 3-10: Bindungsanalyse von rekombinanten SECp43 mit tRNA^{Sec} mittels REMSA. Als Negativkontrolle (-) diente eine Probe ohne Protein, eine Probe mit Trit1 (1µg = 18,87 pmol) als Positivkontrolle (+). **(A)** Erster Interaktionstest von SECp43 mit der tRNA^{Sec}. Es ist eine geshiftete schwache Bande zu sehen, das Signal der freien tRNA^{Sec} hingegen nicht. Reaktionsansatz: gelabelte tRNA^{Sec} (10000 cpm), je Protein 1µg, 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor. **(B)** Titration von SECp43 sowie die Konkurrenz mit unmarkierter (kalter) tRNA^{Sec}. Trotz Titration von SECp43 ist Signalstärke der geshifteten Bande unverändert. Zudem ist keine Konkurrenz erkennbar, das Signal blieb trotz Zugabe von kalter tRNA^{Sec} unverändert. Reaktionsansatz: gelabelte tRNA^{Sec} (10000 cpm), 1x Bindepuffer bzw. in Spur 8 1x Bindepuffer D (Bp.D), 1x Proteaseinhibitor, RNase-Inhibitor (20U), BSA (0,3 µg/µl).

Bindungsanalyse von *in vitro* translatiertem SECp43 mit tRNA^{Sec}

Um die Ergebnisse der Analysen mit rekombinantem SECp43 zu verifizieren, wurde zudem die Interaktion von *in vitro* translatiertem SECp43 mit der radioaktiv markierten tRNA^{Sec} untersucht. Da das *in vitro* translatierte SECp43 nach der Reaktion aufgrund der geringen Ausbeute nicht aufgereinigt und der gesamte Reaktionsansatz direkt eingesetzt werden musste, wurde dieser zur Beseitigung der Template-mRNA und weiteren möglichen vorhandenen RNAs vor dem REMSA mit RNase A behandelt und anschließend die Reaktion mit DEPC, gelöst in H₂O, abgestoppt. Zum Vergleich wurde parallel ein gleicher Reaktionsansatz unbehandelt eingesetzt und beide im REMSA titriert (Abb. 3-11).

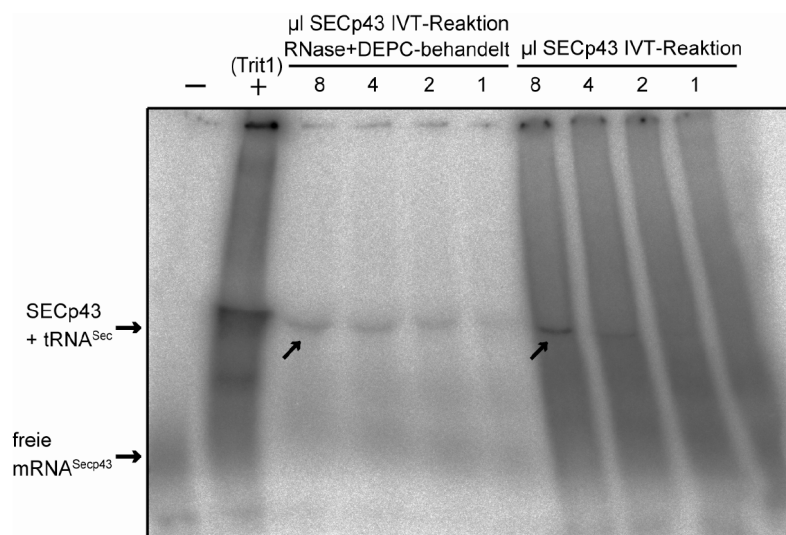


Abbildung 3-11: Interaktion von titriertem *in vitro* translatiertem SECp43 mit tRNA^{Sec}. Die Proben beider Ansätze (mit RNase behandelten und unbehandelten SECp43 *in vitro* Translationsreaktion (IVT)) zeigen jeweils eine geshiftete Bande, dessen Intensität mit abnehmendem Volumen an SECp43 IVT-Reaktion schwächer wird. Die Proben des RNase-behandelten Ansatzes zeigen ein deutlich stärkeres Signal ohne Hintergrund. Als Negativkontrolle (-) diente eine Probe ohne SECp43 IVT-Reaktion, als Positivkontrolle (+) eine Probe mit Trit1 (1 µg = 18,87 pmol). Reaktionsansatz: ³²P-markierte tRNA^{Sec} (20000 cpm), 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor, RNase-Inhibitor (20U).

In allen Spuren konnte eine verzögerte Bande im Vergleich zur Negativkontrolle und unterhalb der dominanten Bande der Positivkontrolle Trit1 detektiert werden. Auch ist eine Abnahme der Bandenintensität bei Abnahme des eingesetzten IVT-Reaktionsvolumens bei beiden Ansätzen zu sehen. Hervorzuheben ist, dass die Titration des mit RNase A behandelten Reaktionsansatzes deutlich stärkere Banden

zeigt als die des unbehandelten Reaktionsansatzes, bei dem die Spuren einen signifikanten grauen Hintergrund aufweisen. Unspezifische Bindungen von Komponenten des Ansatzes wie der Template-mRNA mit der markierten tRNA^{Sec}, die die eigentliche Bindung überdecken, wäre naheliegend, was durch die RNase A-Behandlung unterbunden wurde. Da auch die markierte tRNA^{Sec} Substrat für die RNase A darstellt und diese vermutlich nicht komplett durch das DEPC-H₂O inhibiert wird, jedoch eine Bande in jeder Spur deutlich sichtbar ist, könnte man annehmen, dass die tRNA^{Sec} im Komplex mit SECp43 vor Abbau durch RNase geschützt ist

Bindungsanalyse von SECp43 mit der eigenen mRNA

Die Daten der qRT-PCR von Exon 3/4 der SECp43-mRNA (siehe Abb. 3-1 D) zeigten einen signifikant erhöhten mRNA-Spiegel bei den KO-Tieren verglichen mit den Kontrolltieren. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass die SECp43-mRNA einer negativen Autoregulation durch das eigene Protein unterworfen ist, die durch die Mutation ausgeschaltet ist. Infolgedessen wurde die Interaktion vom rekombinanten sowie *in vitro* translatierten SECp43 mit seiner eigenen mRNA untersucht. Weil ein möglicher SECp43-mRNA^{SECp43}-Komplex mit einer 864 bp langen mRNA größer ist, als einer mit einer kompakten tRNA, wurde für diesen REMSA eine veränderte Gelzusammensetzung gewählt. Dabei wurde die Acrylamidkonzentration auf 5 % reduziert und das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid zu 37,5:1 geändert, so dass das Gel großmaschiger wurde. In Abbildung 3-12 A sieht man in Spur 1 die ungebundene mRNA^{Secp43} sowie in Spur 2 die Probe mit der mRNA^{Secp43} und dem SECp43-IVT-Ansatz. Dessen Geltasche weist ein radioaktives Signal auf und zudem ist keine Bande der freien mRNA^{Secp43} zu sehen. Da die freie mRNA^{Secp43} in der Negativkontrolle trotz langer Laufzeit immer noch nahe der Tasche lokalisiert ist, nehme ich an, dass eine Bindung zwischen mRNA und SECp43 zu einem Komplex stattgefunden hat, dieser aber aufgrund seiner Größe und der konzentrierten Gelzusammensetzung in der Tasche stagnierte und nicht ins Gel diffundieren konnte. SECp43 hat zwei RRM Domänen. Falls diese zwei verschiedene Moleküle mRNA binden können, käme es deshalb zu einer Aggregation, wenn mRNA nicht im großen Überschuss angeboten wird. Die dritte Spur der Probe mit rekombinantem SECp43 zeigt das gleiche Resultat, wie das der Probe mit dem SECp43-IVT-Ansatz in Spur 2.

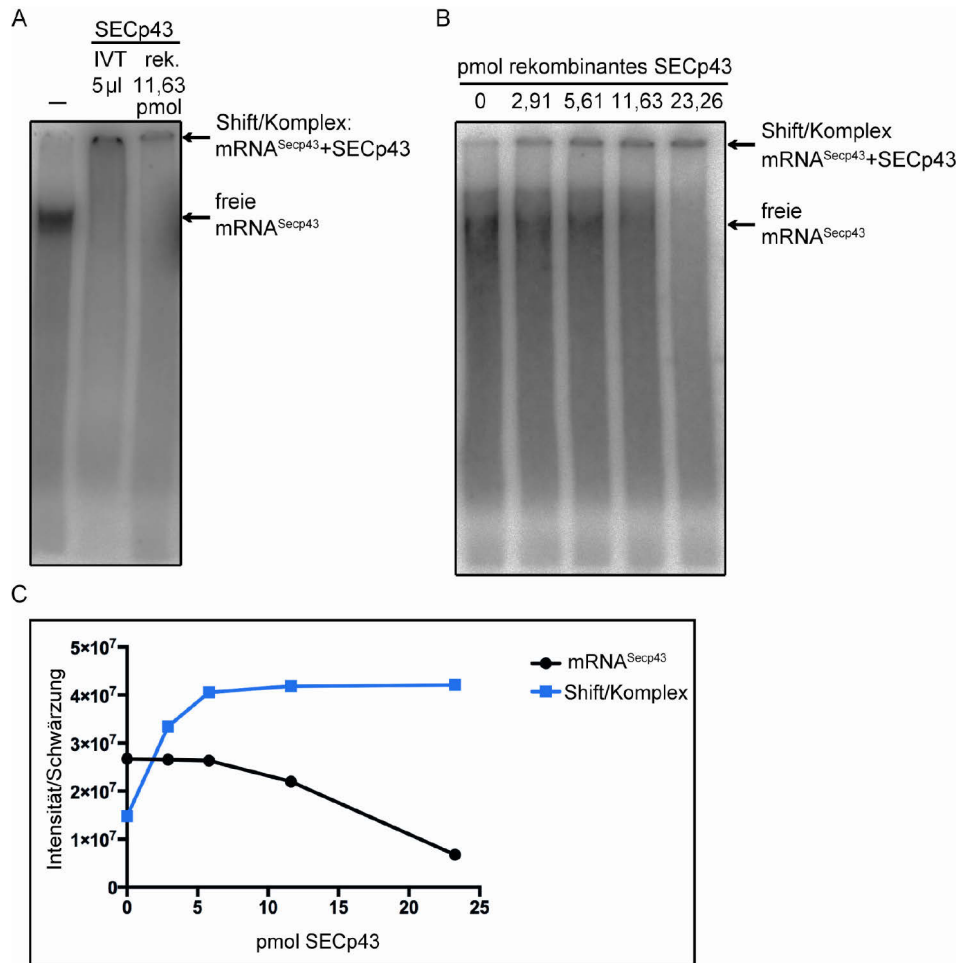


Abbildung 3-12: Interaktion von SECp43 mit eigener mRNA getestet im REMSA. Als Negativkontrolle (-) diente jeweils eine Probe ohne Protein. **(A)** Bindungsanalyse vom rekombinanten (rek.) und *in vitro* translatierten (IVT) SECp43 mit der mRNA^{Secp43}. Im Vergleich zur Negativkontrolle ist jeweils ein Signal in den Taschen zu sehen. Reaktionsansatz: gelabelte mRNA^{Secp43} (23000 cpm), 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor, RNase-Inhibitor (20U). **(B)** Bindungsanalyse von mRNA^{Secp43} mit titriertem rekombinanten SECp43. Mit zunehmender SECp43-Konzentration fällt das Signal der freien mRNA^{Secp43} ab, einhergehend mit einer Zunahme des Signals in den Taschen. Reaktionsansatz: gelabelte mRNA^{Secp43} (23000 cpm), 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor, RNase-Inhibitor (20U). **(C)** Quantifizierung des Schwärzungsgrades der Signale von B mittels ImageJ-Software.

In einem weiteren REMSA bei längerer Laufzeit wurde erneut die Bindung vom rekombinanten SECp43 mit der mRNA^{Secp43} untersucht und das Protein dabei titriert (Abb. 3-12 B).

Auf den ersten Blick sieht man, dass jede Spur mit einem schmierig-grauen Hintergrund unterlegt ist, was auf eine Degradation der markierten mRNA hindeutet. Dennoch ist das Signal der mRNA detektierbar. Eine Abnahme dieses Signals und eine gleichzeitige Zunahme eines Signals in der Geltasche bei ansteigender

Proteinkonzentration sind zu erkennen, was durch die Quantifizierung der Signalstärken bestätigt wird (Abb. 3-12 C). Die erste Spur, mit der Probe ohne Protein, zeigt das stärkste Signal der mRNA^{Secp43}, während kein Signal in der Geltasche sichtbar ist. In der letzten Spur, der Probe mit der höchsten Proteinkonzentration von 23,26 pmol, ist hingegen kein mRNA^{Secp43}-Signal mehr vorhanden. Zudem ist in dieser Spur der graue Hintergrund am schwächsten und das stärkste Signal in der Geltasche, im Vergleich zu den anderen Proben, zu sehen. Es liegt nahe, dass SECp43 seine eigene mRNA bindet. Das bestätigt das Ergebnis des vorherigen Assays. Vermutlich wird durch die Erhöhung der Proteinkonzentration entsprechend mehr gelabelte mRNA^{Secp43} zu einem Komplex gebunden, der jedoch aufgrund seiner Größe, wie im REMSA zuvor, am Boden der Geltasche stagniert. Ist das der Fall, liegt der K_d-Wert von SECp43 hier bei ca. 0,8 pmol (siehe 3.1.2.3). Eine Laufzeiterhöhung sowie veränderte Gelzusammensetzungen konnten schließlich die Migration des angenommenen Komplexes in das Gel nicht gewährleisten. Die REMSAs mit diesen Gelen waren aufgrund deren Instabilität teilweise nicht auswertbar.

3.2. Die Rolle von RNMTL1 in der Selenoproteinbiosynthese

RNMTL1 zählte lange als ein Kandidat für die bisher unbekannte Methytransferase der tRNA^{Sec}-Isoform, mcm⁵Um₃₄. Diese ist für die 2'-O-Methylierung als letzten Schritt der tRNA^{Sec}-Reifung als Sec-Donor für die stressbezogenen Selenoproteine verantwortlich (Hatfield *et al.* 2006; Hatfield und Gladyshev 2002). Frühere Experimente der Arbeitsgruppe (Peter Hoffmann; damals Institut für Experimentelle Endokrinologie – Charité Campus Virchow), in denen RNMTL1-überexprimierende HepG2-Zellen auf dessen Einfluss auf die Selenoproteinbiosynthese untersucht wurden, zeigten eine deutliche Induktion der Aktivität des stressbezogenen Selenoproteins DIO1. Diese Daten untermauerten die Hypothese der RNMTL1 als mögliche Methytransferase. Aufgrund dessen sollten die Daten reproduziert und zusätzlich Deletionsmutanten von RNMTL1 (Abb. 3-13) gleichermaßen getestet werden. Die Deletionsmutanten bestimmter Domänen könnten einen Aufschluss geben und somit die Spezifität des Effekts von RNMTL1 bestätigen. HepG2-Zellen als Modell wurden gewählt, da diese von Hepatozyten der Leber entstammen,

welche wie zuvor in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben, sehr geeignet für die Analyse der Selenoproteinexpression sind.

Des Weiteren sollte eine Bindungsanalyse von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec} durchgeführt werden. Zuletzt sollte ein möglicher Transport von RNMTL1 in die Mitochondrien untersucht werden, da das Protein über eine MTS verfügt und RNMTL1 von verschiedenen RNMTL1-spezifischen Antikörpern u.a. HPA022534 in den Mitochondrien der Zelllinien U-2 OS, A-431 und U-251 MG laut Herstellerangaben detektiert wird (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140374-ETFA/subcellular>).

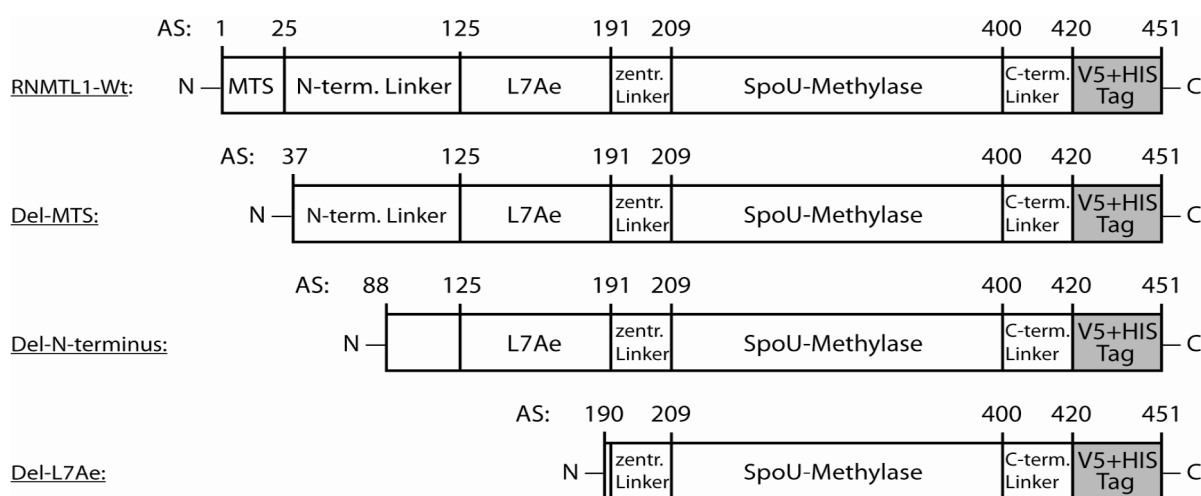


Abbildung 3-13: Schematische Übersicht der klonierten RNMTL1-Konstrukte. AS = Aminosäure, MTS = *mitochondrial targeting sequence*, N-term. = N-terminaler, zentr. = zentraler, C-term. = C-terminaler.

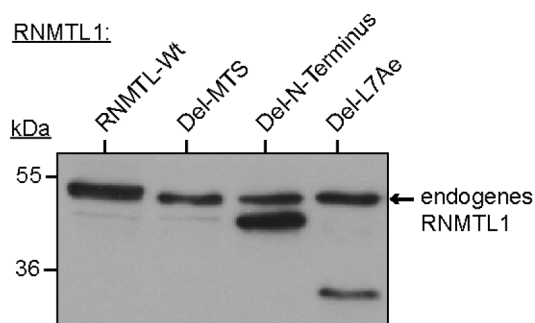
3.2.1. Haben RNMTL1 überexprimierende HepG2-Zellen einen Einfluss auf die Expression stressbezogener Selenoproteine?

3.2.1.1. Transduktion von RNMTL1-Konstrukten mit folgender DIO1-Aktivitätsmessung in HepG2-Zellen zeigen keinen Effekt

Die zuvor klonierten RNMTL1-Konstrukte (s.o.) wurden über ein lentivirales System in HepG2-Zellen transduziert. Diese alternative Methode sollte einen Zeitgewinn gegenüber der konventionellen, stabilen Transfektionsmethode einbringen. Die Proteinlysate der transduzierten HepG2-Zellen wurden mittels SDS-PAGE und folgendem Western Blot, mit dem Antikörper gegen RNMTL1, auf deren

Überexpression getestet (Abb. 3-14 A). Alle Konstrukte bis auf Del-MTS konnten in den HepG2-Zellen überexprimiert werden. Zudem ist das Konstrukt Del-L7Ae nur schwach überexprimiert im Vergleich zu den anderen beiden. Auf der Höhe von ca. 52 kDa sieht man in allen Proben die endogene RNMTL1 der HepG2-Zellen (im Wt überdeckt durch die Überexpression), welche jedoch etwas schwächer als das jeweilige überexprimierte Protein ist. Weitere Versuche, das Konstrukt *Del-MTS* und erneut *Del-L7Ae* in die HepG2-Zellen zu transduzieren, um eine Überexpression zu erreichen, scheiterten (Daten nicht gezeigt).

A



B

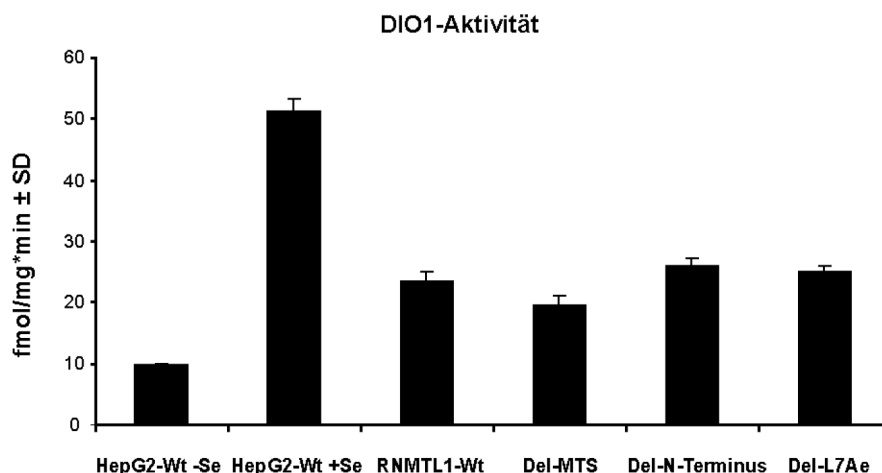


Abbildung 3-14: Western Blot-Analyse und Dejodase-Aktivitätsassay nach Transduktion der RNMTL1-Konstrukte in HepG2-Zellen. (A) Western Blot-Analyse gegen RNMTL1 von Proteinlysaten der, mit den *RNMTL1*-Konstrukten transduzierten, HepG2-Zellen. Alle RNMTL1-Varianten bis auf Del-MTS konnten als überexprimiert detektiert werden, Del-L7Ae jedoch nur schwach. Eingesetzte Proteinmenge: V5-Blot = 80 µg Gesamtprotein, RNMTL1-Blot = 60 µg Cytosolfraktion. (B) Dejodase-Aktivitätsassay von den Proteinlysaten der transduzierten HepG2-Zellen. Die Selen-behandelte Negativkontrolle hat mit Abstand die höchste Aktivität. Die HepG2-Zellen mit den überexprimierten RNMTL1-Konstrukten zeigten hingegen nur sehr geringe Aktivitäten und somit keine Induktion der Dio1-Expression. Die Mittelwerte ± SD sind dargestellt.

Dennoch wurde die DIO1-Aktivität der transduzierten Zellen aller Konstrukte mithilfe des Dejodase-Assays gemessen (Abb. 3-14 B). Als Positiv- und Negativkontrolle wurden HepG2-Wildtyp-Zellen, mit und ohne Natriumselenitbehandlung, mitgeführt. Die mit Natriumselenit supplementierten HepG2-Wt-Zellen (HepG2-Wt +Se) zeigen mit Abstand die höchste Aktivität. Alle Zellen, transduziert mit den *RNMTL1*-Konstrukten, insbesondere die mit *RNMTL1*-Wt transduzierten Zellen, zeigen im Vergleich nur eine halb so hohe Aktivität. Dieses Ergebnis deutet auf keine, durch überexprimierte RNMTL1 induzierte DIO1-Expression hin und kann somit die früheren Daten nicht bestätigen. Erneute Transduktionsversuche von HepG2-Zellen mit *RNMTL1*-Wt und anschließendem Dejodase-Aktivitätsassay konnten ebenfalls die früheren Ergebnisse nicht reproduzieren (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.2. Stabile Transfektion der *RNMTL1*-Konstrukte und deren Einfluss auf die Selenoproteinexpression in HepG2-Zellen

Effekt von RNMTL1 auf die Dejodase-Aktivität

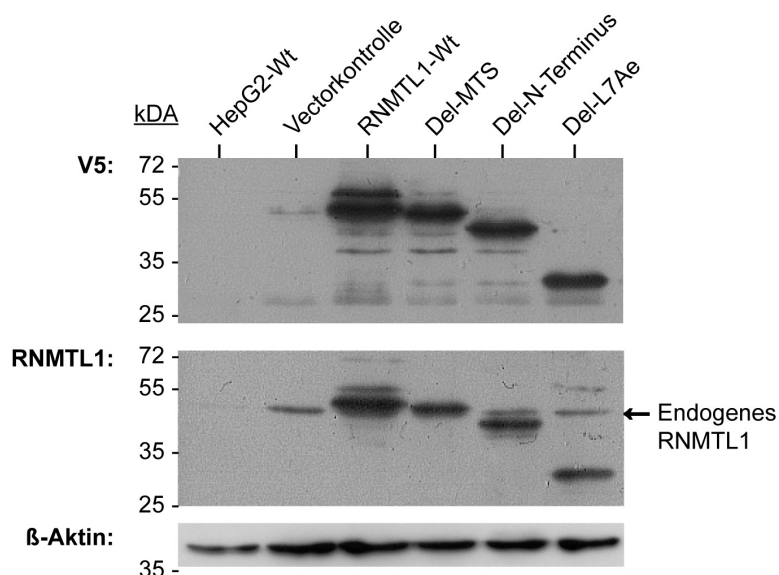


Abbildung 3-15: Western Blot-Analyse der mit den *RNMTL1*-Konstrukten transient transfizierten HepG2-Zellen. Es wurden Western Blots gegen V5-Tag und RNMTL1 von den Proteinlysaten durchgeführt. Es konnte von allen *RNMTL1*-Konstrukten in den HepG2-Zellen eine Überexpression erreicht werden. Jeweils 40 µg Protein/Probe wurde in beiden Blots eingesetzt. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

Da die ersten Versuche, die früheren Daten mittels Transduktion der RNMTL1-Konstrukte zu reproduzieren, scheiterten, wurden diese entsprechend der damaligen Versuchsdurchführung über die konventionelle Methode der stabilen Transfektion mit dem gleichen Vektor in die HepG2-Zellen eingebracht.

Die Analyse der Transfektionseffizienz (transient) im Western Blot zeigt die erfolgreiche Transfektion aller vier Konstrukte und deren Überexpression in der zu erwartenden Größe in den Zellen (Abb. 3-15). Die Negativkontrollen (HepG2-Wt und Vektorkontrolle) zeigten im WB gegen den V5-Tag wie erwartet kein Signal, bei dem Anti-RNMTL1-WB hingegen schwach die erwartete Bande der endogenen RNMTL1 bei ca. 52 kDA.

Die später kultivierten stabilen Einzelklone aller RNMTL1-Konstrukte wurden ebenfalls auf deren Überexpression im Western Blot mit Antikörper gegen den V5-Tag untersucht (Daten nicht gezeigt). Die 2 - 6 der am stärksten exprimierenden Zellklone je RNMTL1-Konstrukt wurden für die Analyse der Selenoproteinexpression ausgewählt. Nach vorheriger Natriumselenitbehandlung wurde im Dejodase-Assay deren Dejodase-Aktivität gemessen (Abb. 3-16). Die HepG2-Wt-Negativkontrollen zeigen wie erwartet eine sehr geringe Aktivität und zudem eine 2-fach höhere Aktivität der Selen-behandelten Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den Unbehandelten. Der damals mit *RNMTL1*-Wt transfizierte Zellklon Fulllength 11 (FI11) mit induzierter Dejodase-Aktivität wurde als Positivkontrolle mitgemessen. Er bestätigt die damals gemessene hohe Dejodase-Aktivität. Die Leervektorkontrolle als eigentliche Negativkontrolle offenbart aber erstaunlicherweise eine ähnlich hohe Aktivität. Die einzelnen, mit *RNMTL1*-Wt, *Del-MTS* und *Del-N-Terminus*, stabil transfizierten Zellklone zeigen jedoch jeweils unterschiedliche Werte innerhalb ihrer Gruppen. So besitzt Klon #2 mit Abstand die höchste Aktivität. Bei den weiteren Zellklonen, transfiziert mit demselben *RNMTL1*-Wt-Konstrukt, wurden deutlich geringere, voneinander abweichende Aktivitäten gemessen. Diese unterschiedlichen Werte zeigen keine signifikante Induktion der DIO1-Expression durch RNMTL1-Wt überexprimierende HepG2-Zellen, da vor allem die Leervektorkontrolle eine ähnlich hohe Aktivität aufweist. Auffallend sind jedoch die Werte der Zellklone der Mutante *Del-L7Ae*, die alle übereinstimmend eine sehr geringe Aktivität, entsprechend der untransfizierten HepG2-Wt-Negativkontrollen, aufweisen. Das deutet zumindest auf einen Effekt der Mutante *Del-L7Ae* auf die Dejodase 1 hin.

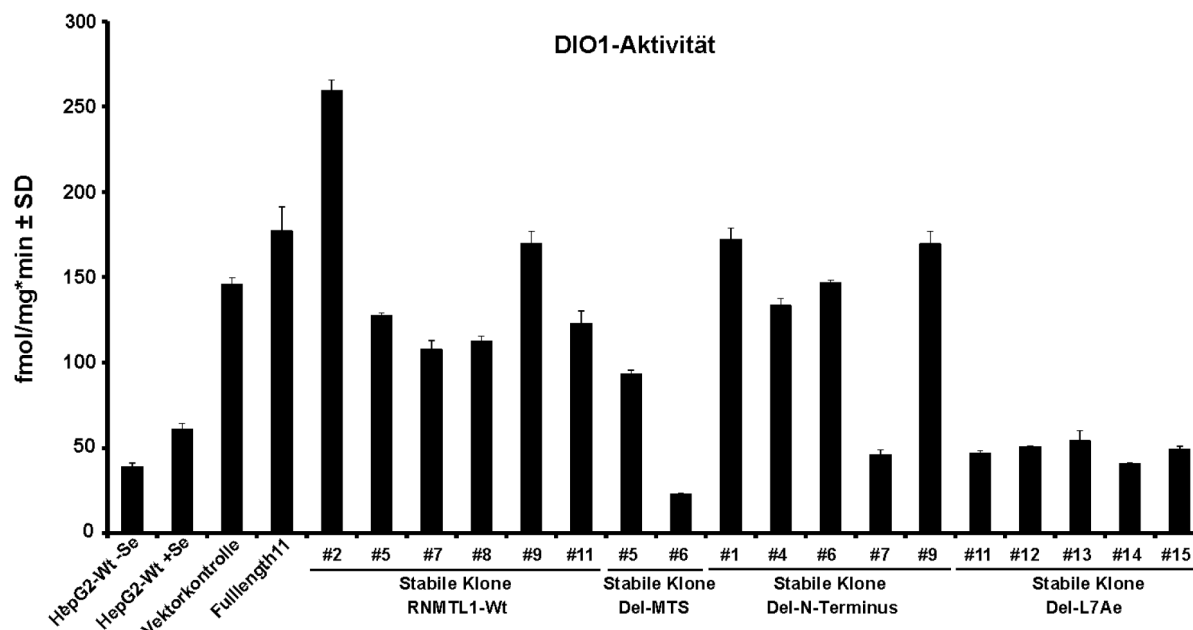


Abbildung 3-16: Dejodase-Aktivitätsassay von Proteinproben der mit RNMTL1-Konstrukten stabil transfizierten HepG2-Zellklone. Die mit *RNMTL1-Wt*, *Del-MTS* und *Del-N-Terminus* stabil transfizierten Zellklone zeigen sehr unterschiedliche Werte innerhalb ihrer Gruppen. Die Zellklone transfiziert mit *Del-L7Ae* hingegen offenbaren alle einheitlich eine geringe Aktivität. Mit Selen behandelte und unbehandelte HepG2-Wt-Zellen und eine Vektorkontrolle dienten als Negativkontrolle. Der damals transfizierte HepG2-Zellklon „Fulllength 11“ wurde als Positivkontrolle mitgeführt. #(Zahl) = stabiler Einzelklon. Es sind die Mittelwerte \pm SD angegeben.

Einfluss von RNMTL1 auf die Selenoproteinexpression

In Abbildung 3-17 sind von den zuvor im DIO-Assay gemessenen Zelllysaten mehrere Western Blot-Analysen, getestet mit verschiedenen Antikörpern, und deren Quantifizierungen, dargestellt. Als Beladungskontrolle diente die Ponceau S-Färbung. Alle Western Blots zeigen, wie erwartet, eine wesentlich höhere Expression des jeweils analysierten Selenoproteins in der mit Selen behandelten Negativkontrolle HepG2-Wt +Se als in der unbehandelten HepG2-Wt –Se.

Zunächst wurde zum Nachweis korrekt gewählter Zellklone ein Western Blot gegen den V5-Tag, den jedes RNMTL1-Konstrukt C-terminal besitzt, durchgeführt. Bis auf den mit *RNMTL1-Wt* transfizierten Klon #9 und den mit *Del-N-Terminus* transfizierten Klon #4, zeigen alle anderen Klone die erwartete Expression der jeweiligen RNMTL1-Konstrukte bzw. die Negativkontrollen kein Signal.

Um die Ergebnisse des Dejdase-Aktivitätsassays zu untermauern, wurde die DIO1-Expression im Western Blot mit einem Antikörper gegen DIO1 untersucht. Die sichtbaren Banden spiegeln durch ihre unterschiedliche Ausprägung, bestätigt durch

deren Quantifizierung, exakt das Ergebnis der zuvor gemessenen Deiodase-Aktivitäten wider.

Zudem wurde die Expression weiterer Selenoproteine dieser Proben analysiert, da diese durch die Überexpression der RNMTL1-Konstrukte eventuell beeinflusst wurden. Aus dem Western Blot gegen SePS ist jedoch keine Tendenz einer Veränderung der SePS-Expression ersichtlich. Die Bandenstärke innerhalb der Gruppen variiert leicht und die Gruppen zueinander, vor allem zur Leervektor- und HepG2-Wt+Se-Kontrolle, zeigen keinen signifikanten Unterschied, was durch die Quantifizierung belegt wird.

Zuletzt wurde das Protein GPX2 untersucht. Man kann keine sichtbaren signifikanten Unterschiede der Bandenstärke und somit der GPX2-Expression zwischen den einzelnen, mit den *RNMTL1*-Konstrukten transfizierten, Zellklongruppen und insbesondere im Vergleich zur Leervektor- und HepG2-Wt+Se-Kontrolle erkennen.

3.2.2. Bindungsanalyse von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec}

Die Hypothese, RNMTL1 sei ein Kandidat für die 2'-O-Methyltransferase der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um, impliziert eine mögliche Bindung an die tRNA^{Sec}. Aufgrund dessen sollte, wie schon zuvor für die SECp43-Bindungsstudien beschrieben, diese mögliche Interaktion mittels des REMSA untersucht werden. Dafür wurde rekombinantes RNMTL1 exprimiert und aufgereinigt sowie die für die SECp43-Bindungsanalyse verwendete *in vitro* transkribierte ³²P-markierte tRNA^{Sec} eingesetzt.

3.2.2.1. Expression und Aufreinigung von rekombinanter RNMTL1

RNMTL1 wurde, wie auch SECp43, rekombinant in dem *E.coli*-Stamm BL21 Star exprimiert und anschließend mittels C-terminalen 10x His-Taq über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das Eluat und die Kontrollen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot sowie auch im Coomassie-Gel überprüft (Abb. 3-18 A).

Hervorzuheben ist, dass RNMTL1 in Form von sechs Banden im Western Blot detektiert wird. Drei kleinere Banden bei einer Größe von ca. 33, 35 und 37 kDa sowie drei größere Banden von ca. 46, 50 und 53 kDa, wobei die Größte bei 53 kDa als dominanteste zu sehen ist. Es ist anzunehmen, dass diese das vollständige

RNMTL1 darstellt, da die endogene RNMTL1 bei HepG2-Zellen ebenso bei einer Größe von ca. 51 kDa detektiert wird (siehe Abb. 3-14 A + 3-15). Die kleineren Banden deuten auf trunkierte Formen von RNMTL1 hin. Die Nicht-Induktionskontrolle zeigt im Western Blot sowie auch im Coomassie-Gel wie erwartet keine RNMTL1-Expression. Zudem weisen das klare Lysat nach Induktion und der Durchfluss ebenfalls kein RNMTL1 auf, was an einer zu geringen Konzentration in den beiden Proben liegen kann. Zudem könnte die Bindung an die Ni-NTA-Agarose so effizient gewesen sein, dass im Durchfluss RNMTL1 kaum detektierbar ist. In den Proben der Waschschrte 1+2 wird in beiden Analysen nur rudimentär RNMTL1 detektiert, was auf einen geringen Verlust von RNMTL1 durch die Waschschrte hinweist. Wie zu erwarten, ist in dem Eluat, neben der Bead-Kontrolle, RNMTL1 am stärksten vorhanden, jedoch durch die Anwesenheit vieler Histidin-reicher *E.coli*-Kontaminanten in unreiner Form. Die Bead-Kontrolle zeigt, dass die Elution nicht vollständig war. Große Mengen an RNMTL1 waren weiterhin an der Ni-NTA-Agarose gebunden. Die eingesetzte Konzentration der Bead-Kontrolle in der SDS-PAGE konnte aber nicht bestimmt werden, wodurch kein Vergleich mit den anderen Proben gezogen werden darf.

Die Elutionsfraktion wurde aufkonzentriert und in kleinerem Maßstab erneut, wie zuvor für SECp43 beschrieben, aufgereinigt, um eine höhere Reinheit der rekombinanten RNMTL1 zu erzielen. Die Elution erfolgte über einen Imidazolgradienten, wobei die höchste Ausbeute mit dem größten Reinheitsgrad die Elutionsfraktion 4, mit 250 mM Imidazol, aufweist (Abb. 3-18 B). Zudem zeigt Elutionsfraktion 5, mit 500 mM Imidazol, ebenfalls RNMTL1 ohne sichtbare Kontaminationen, jedoch in geringerer Ausbeute. Im Durchfluss ist weiterhin RNMTL1 in großer Menge vorhanden, das offensichtlich nicht komplett an die Ni-NTA-Agarose gebunden hat. Außerdem war bei dieser Aufreinigung die Elution ebenfalls nicht vollständig, da in der Bead-Kontrolle im Western Blot sowie auch im Coomassie-Gel weiterhin RNMTL1 detektierbar ist. Die Elutionsfraktion 4 und 5 wurden gepoolt, aufkonzentriert, die Proteinkonzentration bestimmt und in dem folgenden REMSA eingesetzt.

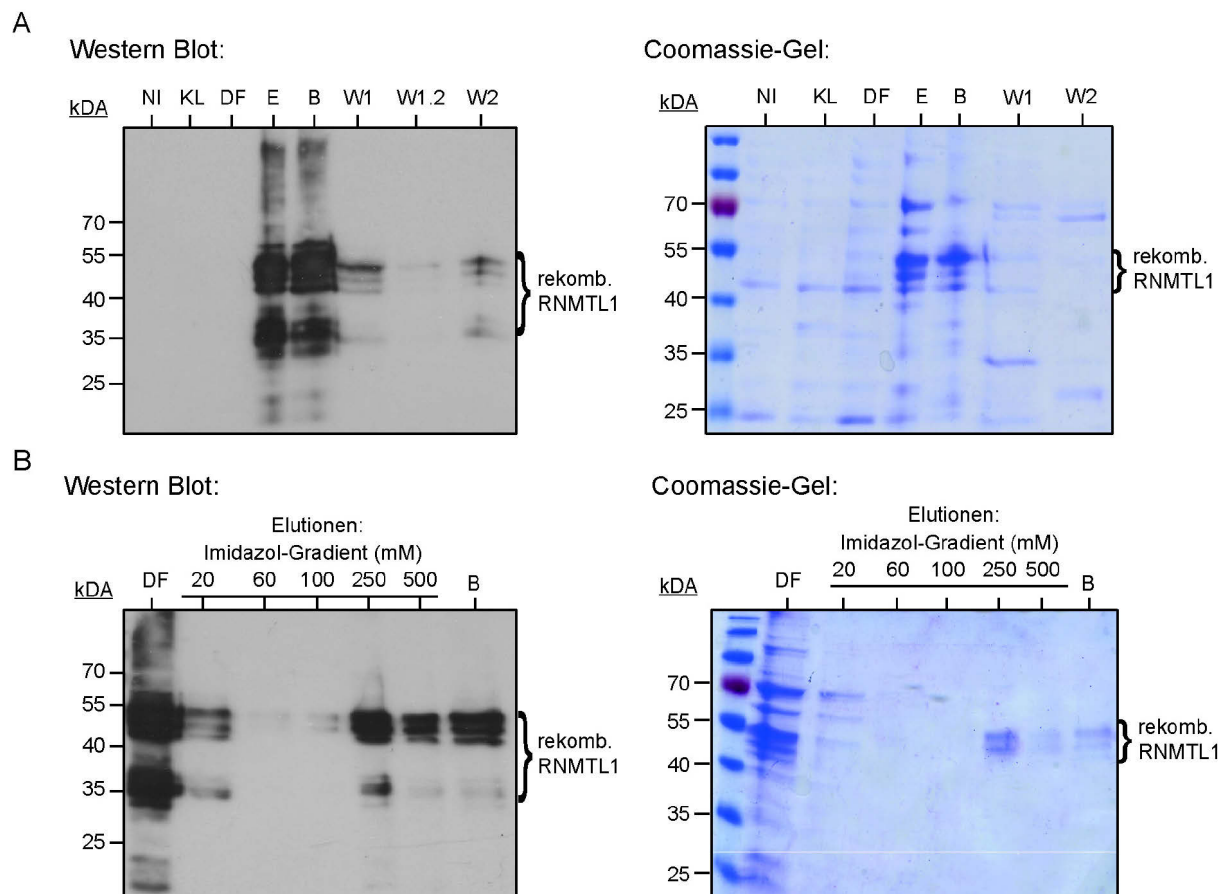


Abbildung 3-18: Aufreinigung von rekombanter RNMTL1 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. (A) Analyse der Expression und ersten Aufreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographiesäule mittels Western Blot (Primärantikörper: Mouse- α -His) und Coomassie-Gel. Es wurde bei beiden Analysen mit Ausnahme der Waschkontrolle 1.2 (W1.2) das identische Auftragsschema verwendet: Nicht-Induktionskontrolle (NI), Klares Lysat (KL), Durchfluss (DF), Eluat (E), Agarasebead-Kontrolle (B), Waschkontrolle 1 (W1) und Waschkontrolle 2 (W2). Bei beiden Analysen ist im Eluat neben Kontaminationen rekombinante RNMTL1 in Form von ca. sechs Banden am stärksten repräsentiert. (B) Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse der zweiten Aufreinigung mittels Elution über einen Imidazolgradienten in Ni-NTA-Spin Columns. Beide Analysen, mit identischem Auftragsschema, zeigen in der Elutionsfraktion mit 250 mM Imidazol die höchste Ausbeute mit dem höchsten Reinheitsgrad an rekombanter RNMTL1.

3.2.2.2. Bindet RNMTL1 an die tRNA^{Sec} *in vitro*?

Wie zuvor für SECp43 geschildert, wurde in einem REMSA die Interaktion von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec} getestet. Trit1, zuvor als Positivkontrolle etabliert (siehe 3.1.2.3), wurde dementsprechend mitgeführt. Im selben Assay wurden auch weitere Proteine analysiert, welche in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurden. In Abbildung 3-19 sieht man in der letzten Spur, der Probe mit RNMTL1 und der

tRNA^{Sec}, mittig ein sehr schwaches Signal, das auf eine mögliche schwache Interaktion beider Komponenten hindeutet. Das Signal ist auf ungefähr der gleichen Höhe lokalisiert wie das Signal der Sonde mit SECp43 (siehe Abb. 3-10 A).

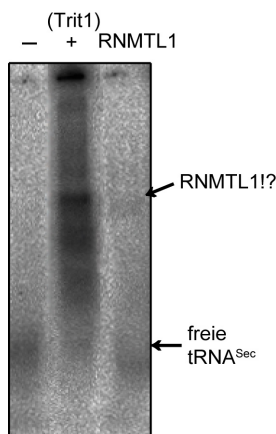


Abbildung 3-19: Bindungsanalyse von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec}. Es ist ein schwaches Signal bei der Probe mit RNMTL1 zu sehen. Parallel dazu ist das Signal der freien tRNA^{Sec} schwächer im Vergleich zu der Negativkontrolle. Reaktionsansatz: gelabelte tRNA^{Sec} (10000 cpm), je Protein 1µg, 1x Bindepuffer, 1x Proteaseinhibitor.

3.2.3. RNMTL1-Transport in Mitochondrien

Ein Transport von RNMTL1 in Mitochondrien liegt aufgrund der MTS nahe. Zur Überprüfung wurden zunächst aus HepG2-Zellen Mitochondrien isoliert und die einzelnen Proben (Zellrestpellet, Überstand und Mitochondrienpellet) in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Präsenz von RNMTL1 mithilfe eines spezifischen Antikörpers untersucht.

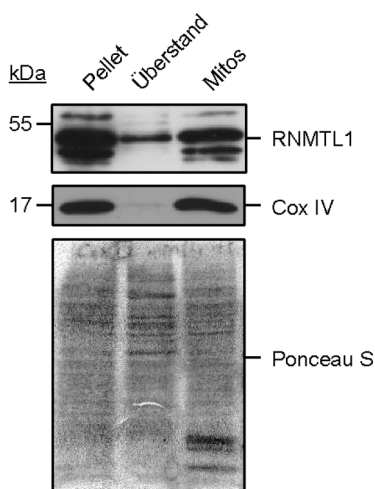


Abbildung 3-20: Western Blot-Analyse der RNMTL1-Lokalisation nach Mitochondrien-isolation aus HepG2-Zellen. Als Kontrolle für die Isolation der Mitochondrien wurden dieselben Proben im WB auf CoxIV als Mitochondrienmarker getestet. Ponceau S-Färbung diente als Beladungskontrolle. Die Isolation war erfolgreich, CoxIV ist im Mitochondrienpellet (Mitos) stark repräsentiert. RNMTL1 ist ebenfalls in dieser Fraktion deutlich detektierbar.

Zum Nachweis der Mitochondrien diente ein weiterer Western Blot der Proben zur Detektion von Cox IV (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit IV), die als Bestandteil der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. In Abbildung 3-20 ist eine Anreicherung von RNMTL1 und zudem von Cox IV in dem Mitochondrienpellet zu erkennen. Eine erfolgreiche Isolation von Mitochondrien aus den HepG2-Zellen und zudem eine Lokalisation von RNMTL1 in den Mitochondrien liegt nahe. Im cytosolischen Überstand hingegen ist, wie zu erwarten, RNMTL1 nur sehr schwach und Cox IV fast gar nicht zu detektieren.

Weiterhin wurden zwei Importassays mit radioaktiv markierten, *in vitro* translatierten RNMTL1-Wt sowie der Deletionsmutante Del-MTS in die Mitochondrien von HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), in Kooperation durch die AG Voos (Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Institut für Biochemie und Molekularbiologie), durchgeführt.

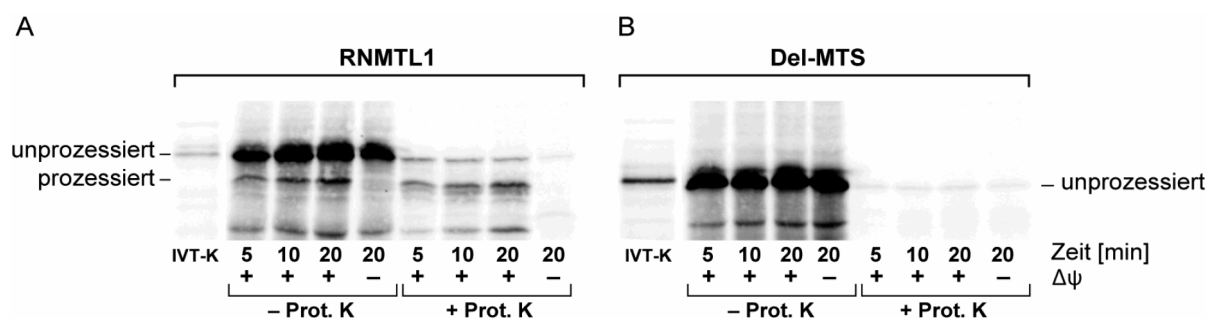


Abbildung 3-21: Radioaktive Importassays von RNMTL1-Wt und der Mutante Del-MTS in Mitochondrien von HeLa-Zellen, analysiert mittels SDS-PAGE und Phosphorimaging. In beiden Assays wurde der Import nach 5, 10 und 20 min gemessen. In einem weiteren Ansatz wurde das Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) durch Behandlung mit Antimycin, Oligomycin und Valinomycin ausgeschaltet. Es wurden jeweils alle Ansätze einmal mit und einmal ohne Proteinase K(Prot.K)-Behandlung untersucht. Als Kontrolle für die unprozessierte Form diente das *in vitro* translatierte Protein (IVT-K). **(A)** Ein Import von RNMTL1 in die Mitochondrien ist erkennbar. Es ist in den Proben mit Membranpotenzial die prozessierte RNMTL1 in Form einer zweiten schwächeren Bande detektiert. **(B)** Der Importassay von Del-MTS zeigt keinen Import aufgrund der bereits fehlenden MTS.

Bei beiden Assays (Abb. 3-21 A+B) sieht man in Spur 1 das radioaktiv markierte Protein als Kontrolle nach der *in vitro* Translation (IVT-K). Im ersten Assay mit RNMTL1-Wt ist jeweils nach 5, 10 und 20 min eine prozessierte Form des Proteins zu sehen. In der Probe hingegen, behandelt mit Antimycin, Oligomycin und

Valinomycin zur Zerstörung des Membranpotenzials ($\Delta\Psi$), ist nach 20 min keine prozessierte RNMTL1 detektierbar. Das lässt auf einen Import von RNMTL1 in die Mitochondrien schließen, da vermutlich während des Imports die MTS abgespalten wird, jedoch nach Zerstörung des Membranpotenzials kein Import und die damit verbundene Prozessierung stattfindet. Zur weiteren Bestätigung wurden dieselben Proben in einem weiteren Ansatz nach dem Import zusätzlich mit Proteinase K behandelt. Dabei wurde in allen Proben die im Cytosol befindliche, unprozessierte RNMTL1-Wt weitestgehend degradiert, die prozessierte Form jedoch blieb aufgrund der Lokalisation im Mitochondrium davor geschützt. Fehlt die MTS, so kommt kein Import in die Mitochondrien zustande und das IVT-Protein wird vollständig durch die Proteinase K im Cytosol abgebaut, wie im zweiten Assay zu erkennen war.

4. Diskussion

4.1. SECp43 als potenzieller Biosynthesefaktor bei der Selenoproteinbiosynthese

Es gibt bisher viele Hinweise, dass SECp43 eine Rolle bei der Selenoproteinbiosynthese spielt. Es wurde zufällig eine Interaktion der tRNA^{Sec} mit SECp43 nach Aufreinigung von HeLa-Zellextrakt über eine mit SECp43-Antikörper beschichtete Säule entdeckt. Zudem wurde von derselben Arbeitsgruppe eine Interaktion von SECp43 mit einem 48 kDa-Protein, heute bekannt als Sepsecs, beobachtet (Ding und Grabowski 1999). Weiterführende Experimente zeigten eine Reduktion der 2'-O-methylierten tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um sowie eine Reduktion der Expression bestimmter Selenoproteine nach dem *knockdown* von *Secp43* in NIH3T3-Zellen (Xu *et al.* 2005). Diese Befunde gaben den Anlass, die Rolle von SECp43 innerhalb der Selenoproteinbiosynthese *in vivo* am Mausmodell zu erforschen sowie die Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vitro* zu verifizieren.

4.1.1. Versuche zur Inaktivierung von *Secp43*

Zwei Mausmutanten wurden im Labor von Dr. Dolph Hatfield am National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA generiert. Bei der ersten Mausmutante erfolgte die Inaktivierung von *Secp43* durch eine *in frame*-Deletion von Exon 3 und Exon 4, wodurch die erste RRM-Domäne zur Hälfte betroffen war. Die konstitutive KO-Mutante zeigte jedoch keinen Effekt sowohl auf die embryonale Entwicklung als auch auf die Selenoproteinexpression in den untersuchten Organen (Mahdi *et al.* 2015). Daraufhin wurden bei der weiteren Mausmutante die Exons 7 und 8 konstitutiv, im C-terminalen Bereich des Proteins deletiert, wodurch die Tyr-reiche Region (Exon 7) unterbrochen wurde. In diesem Fall lag eine *out of frame*-Deletion vor, so dass das Exon 9 ebenfalls inaktiviert wurde. Diese Variante führte als konstitutive Mutante zur embryonalen Letalität (Mahdi *et al.* 2015). Der Entwicklungsdefekt wurde zunächst als Hinweis auf die Störung der Selenoproteinbiosynthese aufgefasst, da die Inaktivierung von *Trsp* (Bosl *et al.* 1997) sowie auch *Secisbp2* (Seeher, Atassi, *et al.* 2014), welche eine gestörte Selenoproteinexpression bedingen, ebenfalls zur

embryonalen Letalität der jeweiligen Mausmutanten führen. Deshalb haben wir eine leberspezifische Inaktivierung von *Secp43*^{Δ7+8} durchgeführt, um die hepatische Selenoproteinexpression der Mausmutanten genau zu analysieren.

4.1.2. Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf die hepatische Selenoproteinexpression

Die leberspezifische Inaktivierung von *Secp43* über Deletion von Exon 7 und 8 in der Maus ist ein gutes Modell zur Untersuchung der Selenoproteinbiosynthese, da Hepatozyten viele Selenoproteine exprimieren, aber auch eine komplette Einstellung der Selenoproteinexpression tolerieren können (Schweizer *et al.* 2005; Streckfuss *et al.* 2005). Eine Erklärung dafür wäre eine Kompensation durch die Expression alternativer Proteine und Faktoren. So bedingt das Fehlen von antioxidativen Selenoproteinen, z.B. von *Txnrd1*, eine Induktion der *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)*-abhängigen Genaktivierung einhergehend mit der kompensatorischen Expression von z.B. verschiedener Glutathion-S-Transferasen (Seeher, Atassi, *et al.* 2014; Sengupta *et al.* 2008; Suvorova *et al.* 2009; Suzuki *et al.* 2008). Demzufolge führt eine Inaktivierung der tRNA^{Sec} bei gleichzeitiger Inaktivierung von *Nrf2* zu einem Leberversagen (Suzuki *et al.* 2008). Weiterhin ist bekannt, dass eine *Txnrd1*-Inaktivierung bei gleichzeitiger beeinträchtigter Glutathion-Biosynthese zu einer Degeneration der Leber führt (Prigge *et al.* 2012). Jedoch konnte kein Leberschaden in den *Alb-Cre; Secp43*^{fl/fl}-Mäusen beobachtet werden, die gemessenen Transaminasen-Spiegel im Plasma lagen im Normbereich (Tab. 3-1). Auch konnte durch dieses Ergebnis eine Beeinträchtigung der Ergebnisse folgender Analysen ausgeschlossen werden. Dass die Deletion der Exons 7 und 8 von *Secp43* erfolgreich war, konnte durch qRT-PCR gezeigt werden (Abb. 3-1 D).

Die ausführliche Analyse der Selenoproteinexpression in der Leber sowie auch im Plasma konnte keine Hinweise auf einen Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf die Selenoproteinbiosynthese in der Leber der Mausmutanten liefern. Sowohl die Western Blot-Analysen der Selenoproteine (Abb. 3-3) als auch die Aktivitätsmessungen der Selenoenzyme (Abb. 3-5) in den *Alb-Cre; Secp43*^{fl/fl}-Mäusen zeigten unveränderte Werte in den Mutanten. Ebenso verhielt es sich mit dem Plasmaselenspiegel als Marker für die hepatische Sepp-Produktion sowie auch mit der Western Blot-Analyse von Sepp im Plasma (Abb. 3-4). Des Weiteren wurden

auch die mRNA-Spiegel einiger Selenoproteine der *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäuse untersucht (Abb. 3-2), welche jedoch normale Werte zeigten und somit mit den Ergebnissen der entsprechenden Western Blot-Analysen bzw. Aktivitätsmessungen korrelierten. Zudem sind diese mRNA-Spiegel in einigen Fällen auch empfindliche Sensoren für eine reduzierte Se-Verfügbarkeit (Hoffmann *et al.* 2007). Unsere Ergebnisse zeigen, dass es scheinbar keine Antwort auf eine möglicherweise ineffektive Selenverwertung gibt. Wir haben auch die mRNA-Spiegel einiger Selenoproteinbiosynthesefaktoren gemessen (Abb. 3-6 A), um zu sehen, ob es eine kompensatorische Genregulation gibt. Das war nicht der Fall, alle gemessenen mRNA-Spiegel lagen im Normalbereich. So konnte keine Hochregulierung von *Sephs2* beobachtet werden, wie zum Beispiel in *Sepp*-defizienten Mäusen (Hoffmann *et al.* 2007). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist der Initiationsfaktor eIF4a3 ein negativer Regulator der Expression mancher Selenoproteine und bei vorherrschender Se-Defizienz hochreguliert (Budiman *et al.* 2009). Auch dessen mRNA-Spiegel zeigte einen normalen Wert in den *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäusen. Somit ist von keiner Veränderung der Selenoproteinexpression oder einem Mangel an verfügbarem Se auszugehen. Da für Sepsecs eine Bindung zu SECp43 nachgewiesen werden konnte (Ding und Grabowski 1999; Xu *et al.* 2005), wurde neben dessen Transkriptspiegel auch dessen Proteinexpression im Western Blot analysiert, welche ebenfalls keine Veränderung zeigte (Abb. 3-6 B+C). Weitere Untersuchungen, durchgeführt von unserer Kooperationsgruppe an den NIH unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit. So konnte durch eine metabolische Markierung mit ⁷⁵Se-Selenit die Se-Inkorporation in die Selenoproteine der Leber, Niere, Hoden und im Plasma der *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäuse visualisiert werden. Die Autoradiogramme der KO- und Kontrollmäuse waren nahezu identisch (Mahdi *et al.* 2015). Da in kultivierten Zellen nach *knockdown* der *Secp43*-mRNA mittels RNA-Interferenz zu einer Reduktion der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um führte (Xu *et al.* 2005), wurde auch das tRNA^{Sec}-Methylierungsmuster in der Leber von *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäusen mit dem der Kontrollmäuse verglichen. Es konnte jedoch nahezu keine Veränderung im Methylierungsmuster der tRNA^{Sec} von KO- zu Kontrollmäusen beobachtet werden. Eine anschließende Quantifizierung der tRNA^{Sec}-Spiegel in der Leber mittels Northern Blot zeigte bei beiden Mauslinien einen ähnlichen Wert (Mahdi *et al.* 2015).

Da keine Effekte nach Inaktivierung von *Secp43* auf die Selenoproteinexpression in *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäusen festgestellt werden konnten, war eine Analyse der Expression der Nrf2-abhängigen Faktoren nicht notwendig. Zusammenfassend ließ sich kein Phänotyp der Selenoproteinexpression nach *Secp43*-Inaktivierung festmachen.

4.1.3. Rekombinante Expression und Aufreinigung von SECp43 und dessen Interaktion mit tRNA^{Sec} bzw. mRNA^{SECp43} *in vitro*

4.1.3.1. Rekombinante Expression und Aufreinigung

Für Interaktionsstudien mit der tRNA^{Sec} wurde humanes SECp43 rekombinant exprimiert und aufgereinigt, was nicht effizient und nicht sehr rein war. Die Ausbeute war entweder nicht hoch oder der Zellaufschluss war nicht effizient genug. Die Analyse offenbarte mehrere Kontaminanten (Abb. 3-7 A), was meist auf eine geringe Expression hindeutet, häufig bedingt durch einen hohen Grad an proteolytischer Degradation des Zielproteins. Bei der Aufreinigung von rekombinanten His-getaggt Proteinen über eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) koeluieren häufig endogene *E.coli*-Proteine. Diese Kontaminanten besitzen nicht-konsequente His-Reste, welche auf der Oberfläche deren Tertiärstruktur exponiert sind und eine hohe Affinität zu bivalenten Nickel- bzw. Kobaltionen, wie die der Säulenmatrix, haben (Robichon *et al.* 2011). Somit können diese die rekombinant exprimierten Proteine bei der Bindung an die Matrix kompetieren. Bolanos-Garcia *et al.* beschrieben detailliert und klassifizierten diese *E. coli*-Kontaminanten nach deren Affinität und bestimmten die entsprechenden Imidazolkonzentrationen zur Elution dieser (Bolanos-Garcia und Davies 2006). So konnte durch eine weitere Aufreinigung des Eluats über einen Imdizolgradienten ein höherer Reinheitsgrad von SECp43 erreicht werden (Abb. 3-7 B). Eine weitere Möglichkeit zur Beseitigung dieser Kontaminanten besteht in der Verwendung von speziell modifizierten *E. coli*-Expressionsstämmen, wie NiCo21(DE3) und NiCo22(DE3) (Robichon *et al.* 2011) sowie LOBSTR (Andersen *et al.* 2013). Diese *E. coli* BL21(DE3)-Derivate exprimieren genomisch mutierte sowie getaggte Kopien der häufigsten Kontaminanten, wodurch diese eliminiert werden bzw. eliminiert werden können.

Die rekombinante Expression und Aufreinigung von SECp43 war in den folgenden Analysen in Form einer Doppelbande detektierbar. Die obere Bande entsprach dem vollständigen Protein, die untere hingegen stellte vermutlich eine trunkierte Form dar. Beide Formen besitzen einen C-terminalen His-Tag, da beide aufgereinigt sowie mittels Anti-His-Antikörper detektiert wurden. Somit kann bei der trunkierten Form ein N-terminaler Teil proteolytisch abgespalten worden sein. Da in *E. coli* kein alternatives Spleißen stattfindet, kann nur diese häufige proteolytisch bedingte Trunkierung infrage kommen, was aber nicht in allen Fällen negativ sein muss. So wurde z.B. gezeigt, dass eine N-terminale Trunkierung die proteolytische Degradation des Proteins umgehen konnte (Seong *et al.* 2004). Diese Vermutung wird zudem durch das Resultat der alternativen *in vitro* Translation von SECp43 gestützt, bei der nur das vollständige Protein detektiert wurde (Abb. 3-8).

4.1.3.2. Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vitro*

Wie bereits erwähnt, wurde zufällig eine Assoziation von SECp43 mit der tRNA^{Sec} bei der SECp43-Aufreinigung aus HeLa-Zellextrakt über eine SECp43-Antikörpersäule beobachtet, aber eine direkte Bindung von rekombinantem SECp43 mit *in vitro* transkribierter, unbeladener und unmodifizierter tRNA^{Sec} hingegen nicht (Ding und Grabowski 1999). Später wurde von Small-Howard *et al.* im REMSA eine Interaktion von SECp43 mit dem tRNA^{Sec}-EFSec-Komplex in Form eines Supershifts gezeigt, jedoch auch keine Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} allein (Small-Howard *et al.* 2006). In beiden Forschungsarbeiten wurden die Daten der missglückten direkten Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vitro* merkwürdigerweise nicht gezeigt. Aufgrund dessen wurde die Interaktion zwischen der tRNA^{Sec} und SECp43 erneut im REMSA untersucht.

Zunächst wurde mit Trit1 eine Positivkontrolle etabliert (Abb. 3-9 A). Die Assoziation von rekombinantem Trit1 mit der tRNA^{Sec} wurde in Form von drei Signalen detektiert. Trit1, die tRNA^{Sec}-Isopentenyltransferase in Säugern (Fradejas *et al.* 2013), besitzt wie alle eukaryontischen N⁶A₃₇-Isopentenyltransferasen mehrere tRNA-Substrat-Interaktionsregionen sowie ein Zink-Finger-Motiv (NCBI NP_060116), um die tRNA zu erkennen und zu binden (Lamichhane *et al.* 2011). Eine mögliche Erklärung der drei unterschiedlich großen Trit1-tRNA^{Sec}-Komplexe sind proteolytisch bedingte, trunkierte Trit1-Formen, die jeweils mindestens eine tRNA-bindende Region

besitzen. Dass Trit1 nicht 100%ig rein war (Daten nicht gezeigt), stützt diese Annahme. Dementsprechend könnte es auch zu einer unspezifischen Bindung gekommen sein. Eine andere Begründung wäre eine teilweise Aggregation bzw. Multimerisierung von Trit1-tRNA^{Sec}-Komplexen, welche langsamer durch die Gelmaschen diffundieren, was die Beobachtungen der Kompetitortitration sowie der Trit1-Titration (Abb. 3-9 B+C) erklären würde. Bei der Kompetitortitration nimmt die Intensität des untersten Signals anfänglich zu, bei gleichzeitiger Abnahme der oberen Signalstärke, da sich die Aggregation der Komplexe durch Konkurrenz aufgelöst haben und kurzzeitig mehr monomere Trit1-tRNA^{Sec}-Komplexe frei waren. Die gleiche Erklärung würde auf die, sich anders verhaltende, Positivkontrolle kommen, wenn man in der zugegebenen Gesamt-RNA eine Kompetitor-RNA annimmt. Zudem würde bei der Trit1-Titration die schwächer werdende mittlere Bande mit gleichzeitiger Zunahme der obersten Bande bei den beiden höchsten Trit1-Konzentrationen durch die Aggregation der im Überschuss vorhandenen Trit1-tRNA^{Sec}-Komplexe eine Deutung finden.

Die Interaktion von rekombinanten SECp43 und der tRNA^{Sec} resultierte in einem schwachen Signal (Abb. 3-10 A). Zudem war das Signal an freier tRNA^{Sec} kaum zu detektieren, was auf eine gebundene tRNA^{Sec} durch das Protein hindeutet. Eine unspezifische Interaktion z.B. durch Kontaminanten in der SECp43-Probe mit der tRNA^{Sec} muss auch in Betracht gezogen werden, was durch das Ergebnis der Proteintitration sowie der Konkurrenz (Abb. 3-10 B+C) untermauert wird. Da dieses Resultat nicht sehr aufschlussreich war, wurde alternativ *in vitro* translatiertes SECp43 eingesetzt. Beide Ansätze zeigten ein deutliches, der Titration entsprechend abnehmendes Signal, das auf eine SECp43-tRNA^{Sec}-Interaktion schließen lässt (Abb. 3-11). Der ohne RNase behandelte Ansatz zeigte schwächere Signale, dafür aber einen starken Hintergrund in der gesamten Spur, was auf unspezifische Bindungen der Komponenten der *in vitro* Translation mit der tRNA^{Sec} und somit eine teilweise Maskierung des eigentlichen Signals hindeutet. Im weiteren Ansatz wurden diese RNA-Komponenten durch die RNase scheinbar degradiert, kein Hintergrund war sichtbar und das Signal somit intensiver. Zudem wurde die tRNA^{Sec} selber von der RNase nicht degradiert, da deren Aktivität zuvor durch das DEPC abgestoppt wurde. Geht man aber von einer Restaktivität der RNase A aus, scheint der SECp43-tRNA^{Sec}-Komplex die tRNA^{Sec} selbst vor der Degradation protektiert zu haben. Der

IVT-SECp43-Komplex war ähnlich weit durch das Gel diffundiert wie der Komplex mit rekombinantem SECp43 gemessen an der Positivkontrolle.

Zusammenfassend kann man annehmen, SECp43 interagiert mit der tRNA^{Sec}, entgegen den bisher publizierten Daten, auch *in vitro*, wobei diese Befunde noch weiter verifiziert werden müssten und eine unspezifische Bindung noch nicht ausgeschlossen ist. SECp43 besitzt zwei RRM-Domänen, wodurch diese Interaktion jedoch schlüssig wäre.

4.1.3.3. Interaktion von SECp43 mit der eigenen mRNA^{SECp43} *in vitro*

Aufgrund der Messung der *Secp43*-Transkriptspiegel mit Primern gegen die Exons 3 und 4, die eine Hochregulierung des trunkierten *Secp43*-Transkripts in den *Alb-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäusen offenbarte (Abb. 3-1 D), ist eine Autoregulation von SECp43 anzunehmen. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde die Bindung von rekombinantem und *in vitro* translatiertem SECp43 mit der eigenen mRNA^{SECp43} getestet (Abb. 3-12 A). Für beide Ansätze waren Signale in der Geltasche im Kontrast zur Negativkontrolle zu beobachten. Eine Interaktion liegt in beiden Fällen nahe, wobei die angenommenen SECp43-mRNA^{SECp43}-Komplexe aufgrund der mRNA-Größe nicht in das Gel diffundieren konnten. Die freie mRNA^{SECp43} war ebenso nicht weit durch das Gel diffundiert, was diese Erklärung unterstützt, sowie auch die Titration von rekombinantem SECp43. Nach steigender Proteinkonzentration ist eine Abnahme des ungebundenen mRNA^{SECp43}-Signals im Gel mit einhergehendem Anstieg des Signals in der Geltasche detektiert worden (Abb. 3-12 B+C). Auch reduzierte Gelkonzentrationen, die zu einem weitmaschigeren Gel führen, konnten die Diffusion der SECp43-mRNA^{SECp43}-Komplexe nicht gewährleisten. Es ist sogar anzunehmen, dass wie für Trit1 beschrieben, mehrere Komplexe aggregieren und dadurch eine Diffusion in das Gel unmöglich macht. Zusammenfassend kann man sagen, dass SECp43 seine eigene mRNA bindet, was durch die vorhandenen beiden RRM-Domänen möglich ist und somit eine Autoregulation von SECp43 nahe liegt.

4.1.4. *Secp43*-Mutationen zeigen keine Effekte auf die Selenoprotein-expression: mögliche Ursachen

Die erste zu nennende Erklärung, warum kein Einfluss der *Secp43*-Inaktivierung auf die Selenoproteinbiosynthese in den analysierten Mausmutanten zu beobachten war, ist, dass die eingefügten Deletionsmutationen das *Secp43*-Gen nicht funktional ausgeschaltet haben. Es existiert eine Transkriptvariante in der Gendatenbank, der die Exons 2 und 3 fehlen (NCBI XM_006539180.1). Das deutet auf das sogenannte „Exon-Skipping“, dem Überspringen von Exons *in vivo* hin. Des Weiteren detektierte die Western Blot-Analyse von der Leber, Niere und Hoden der ersten Mausmutante mit deletierten Exon 3 und 4 im *Secp43*-Gen (*Secp43*^{Δ3+4}) die trunkierte Form von SECp43, verstärkt in der Leber (Mahdi *et al.* 2015). Da die Deletionen der Exons 2 und 3 sowie der Exons 3 und 4 *in frame* sind, könnte die Funktionalität von SECp43 in diesen Fällen aufrechterhalten geblieben sein, was diese Erklärung stützt. Dabei ist anzumerken, dass die Exons 2 bis 4 den größten Teil der ersten RRM-Domäne kodieren, welche scheinbar für die Funktionalität von SECp43 nicht essentiell ist. Die Deletion der Exons 7 und 8 hingegen führt zu einer *out of frame*-Deletion, wodurch auch das Exon 9 betroffen ist. Somit waren die drei letzten, 110 AS umfassenden Exons der insgesamt 287 AS umfassenden 9 Exons von *Secp43* ausgeschaltet, was die Wahrscheinlichkeit der Funktionsinaktivierung von SECp43 erhöhte. Erwähnenswert ist, dass die mRNA der trunkierten Form von *Secp43*^{Δ7+8} hochreguliert war (Abb. 3-1 D). Dadurch könnte die Vermutung aufkommen, dass diese Deletionsmutation das Protein nicht komplett inaktivierte, jedoch aber zumindest mit der Autoregulation der *Secp43*-mRNA-Spiegel interferierte. Diese Annahme wird durch die, im vorherigen Abschnitt diskutierte REMSA-Interaktionsstudie, SECp43 bindet seine eigene mRNA, untermauert. Bei dieser Deletionsmutante waren beide RRM-Domänen noch intakt, jedoch kodiert Exon 7 die Tyr-reiche Region, welche bei sechs verschiedenen Säugern komplett konserviert ist (Abb. 1-4 B). Da die konstitutive *Secp43*^{Δ7+8}-Inaktivierung zur embryonalen Letalität führte, muss die Tyr-reiche Region von großer Bedeutung für die Funktion des Proteins sein. Diese Feststellung wird durch die beeinträchtigte Bewegungskoordination einer weiteren Mausmutante unserer Arbeitsgruppe, der neuronspezifischen *Secp43*^{Δ7+8}-Mausmutante (Mahdi *et al.* 2015) sowie der

Erkenntnisse über die Expression von SECp43 im Maushirn während der Entwicklung (McKee *et al.* 2005) gestützt.

Eine weitere Erklärung für die Wirkungslosigkeit der *Secp43*-Inaktivierung auf die Selenoproteinbiosynthese in den analysierten Mausmutanten ist, dass SECp43 nicht in den Hepatozyten, sondern möglicherweise in anderen Zelltypen für die Selenoproteinbiosynthese erforderlich ist. Die Analysen der im vorherigen Absatz erwähnten weiteren *Secp43*-Mausmutante, der *Ta1-Cre; Secp43^{fl/fl}*-Mäuse stützen diese mögliche Erklärung jedoch nicht. So ist die Selenoproteinexpression im Gehirn dieser neuronspezifischen *Secp43*-Mausmutanten unverändert, verglichen mit den Kontrollen (Mahdi *et al.* 2015). Es ist nachgewiesen, dass die zerebrale Entwicklung (Wirth *et al.* 2014) sowie die Entwicklung der kortikalen und striatalen Interneurone von der Selenoproteinbiosynthese abhängig sind (Seeher, Carlson, *et al.* 2014; Wirth *et al.* 2010) und schon leichte Störungen dieser führen zu deutlichen neurologischen Defekten (Raman *et al.* 2012; Schweizer *et al.* 2004; Seeher, Carlson, *et al.* 2014; Wirth *et al.* 2010). Die Ausschaltung der tRNA^{Sec} mittels Ta1-Cre führt zu einem starken Kleinhirnhänotyp, der bei den *Secp43*-Mutanten nicht zu sehen war (Wirth *et al.* 2014). Aufgrund dieser Fakten konnte davon ausgegangen werden, dass bei dieser Mutante auch nicht eine minimale Reduktion der Expression von Selenoproteinen im Gehirn übersehen wurde.

SECp43 könnte auch eine, von der Selenoproteinexpression unabhängige Rolle innerhalb der Zelle spielen, was eine dritte mögliche Begründung für den fehlenden Phänotyp nach dem Ausschalten von *Secp43* darstellt. Nach systematischer Analyse der Konservierung des Selenoproteinbiosynthesewegs in Insekten zum Beispiel, konnte in einigen Spezies mit evolutionsbedingter, eingestellter Selenoproteinexpression der Verlust einiger Selenoproteinbiosynthesefaktoren gezeigt werden, u.a. Sephs2 oder Sepsecs. Das *Secp43*-Gen hingegen ist noch im Genom aller Spezies vorhanden, was auf eine mögliche konservierte, von der Selenoproteinbiosynthese unabhängige Funktion von SECp43 hindeutet (Chapple und Guigo 2008). Ein ähnlicher Befund wurde von Otero *et al.* für den parasitischen Pflanzen-Nematoden vom *Tylenchina*-Stamm beschrieben. Diese haben all ihre Sec-Inkorporationsfaktoren und somit die Eigenschaft zum Sec-Einbau verloren, das mit dem Sec-Einbau eigentlich assoziierte *Secp43*-Gen jedoch beibehalten (Otero *et al.* 2014). Als ein weiteres beipflichtendes Beispiel ist abschließend ein rekonstituiertes auf Weizenkeim-basierendes System zur *in vitro* Translation von Selenoproteinen zu

nennen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses System, trotz Abwesenheit von SECp43, allein mit den bekannten basalen Faktoren wie der tRNA^{Sec}, Secisbp2, EF-Sec und den Säugerribosomen funktionell war (Gupta *et al.* 2013). Gegen diese dritte Hypothese sprechen jedoch die Ergebnisse der Interaktionsstudien im zuvor diskutierten Abschnitt, die stark auf eine Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} hindeuten und somit eine Rolle von SECp43 in der Selenoproteinbiosynthese vermuten lässt.

4.1.5. Ausblick zur Analyse der Rolle von SECp43 in der Selenoproteinbiosynthese

Aufgrund der bereits publizierten Ergebnisse, SECp43 assoziierte mit dem heute als Sepsecs bekannten Selenoproteinbiosynthesefaktor (Ding und Grabowski 1999), die *knockdown*-Experimente von *Secp43* in NIH3T3-Zellen, die eine Reduktion der 2'-O-methylierten tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um sowie der Expression bestimmter Selenoproteine zur Folge hatten (Xu *et al.* 2005), die beobachtete Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vivo* sowie mit anderen Faktoren im Komplex *in vitro* (Ding und Grabowski 1999; Small-Howard *et al.* 2006) und zuletzt die Interaktionsstudien dieser Arbeit, ist die Hypothese der Beteiligung von SECp43 in der Selenoproteinbiosynthese nicht ad acta zu legen. So müssten die Interaktionsstudien dieser Arbeit weitergeführt werden. Reinere Proteinproben sowie verschiedene Deletionsmutanten könnten getestet werden und eine Kompetition der beobachteten Interaktion von *in vitro* translatiertem SECp43 mit der tRNA^{Sec} würden diese verifizieren. Bezüglich der Mausmutanten müssten weitere organspezifische *Secp43*^{Δ7+8}-Mausmutanten wie z.B. der Niere analysiert werden, da die konstitutive Inaktivierung embryonal letal war und somit SECp43 in einem spezifischen Gewebe essentiell sein muss, ausgenommen davon, dass das SECp43 durch das eines anderen Gewebes kompensiert werden kann. Eine weitere *Secp43*-Mausmutante, bei der mehr Exons bzw. ein wesentlich größerer Abschnitt von *Secp43*, insbesondere die beiden RRM-Domänen bzw. die zweite RRM-Domäne und die Tyreiche Region gleichzeitig, ausgeschaltet sind, wäre eine weitere Option. Somit würde die Nicht-Funktionalität von SECp43 sichergestellt sein und es ließen sich einige nach dieser Arbeit verbleibenden offenen Fragen aufklären.

4.2. RNMTL1 und die Selenoproteinbiosynthese

Es existieren zwei Isoformen der tRNA^{Sec}, die sich in der 2'-O-Methylierung des Ribosyl-Rests des Wobble-Uridins an der Stelle 34 unterscheiden (Hatfield *et al.* 2006; Hatfield und Gladyshev 2002). Es deutet einiges darauf hin, dass die 2'-O-methylierte Isoform mcm⁵Um für die effiziente Expression stressbezogener Selenoproteine zuständig ist (Carlson *et al.* 2007; Carlson *et al.* 2005). Die zuständige 2'-O-Methyltransferase ist bis heute unbekannt. Aufgrund früherer Experimente unserer Arbeitsgruppe, bei denen RNMTL1-überexprimierende HepG2-Zellen eine Induktion der Aktivität des stressbezogenen Selenoproteins DIO1 zeigten, galt die RNMTL1 als ein vielversprechender Kandidat. Da diese Daten sich auf nur einen Einzelklon bezogen und keine weiterführenden Experimente durchgeführt wurden, wurden diese Daten reproduziert sowie auch verschiedene Deletionsmutationen (Abb. 3-13) zur Analyse der essentiellen Domänen des Enzyms parallel untersucht. Zudem sollte eine Bindungsanalyse nach dem Schema von SECp43 (s.o.) einen weiteren Einblick in die Beziehung von RNMTL1 zur tRNA^{Sec} bringen. Die Vermutung, RNMTL1 wird ins Mitochondrium transportiert, wurde ebenfalls betrachtet.

4.2.1. RNMTL1-Konstrukte überexprimierende HepG2-Zellen zeigen nicht den erwarteten Effekt auf die Expression stressbezogener Selenoproteine

Die Überexpression von RNMTL1 in HepG2-Zellen wurde anfangs über Transduktion mithilfe eines lentiviralen Systems durchgeführt, jedoch konnten nur RNMTL1-Wt und Del-N-Terminus, sowie Del-L7Ae schwach, überexprimiert werden, die Del-MTS hingegen nicht (Abb. 3-14 A). Alle erneuten Transduktionsversuche brachten keine Besserung. Eine mögliche Erklärung ist, die beiden Konstrukte wurden jeweils vollständig bzw. größtenteils nach Integration in das Wirtsgenom wieder ausgestoßen. Die exprimierten trunkierten Proteine könnten auch aufgrund von deren Nicht-Funktionalität schnell von den Zellen komplett bzw. größtenteils degradiert worden sein (Goldberg 2003). Obwohl nicht alle Konstrukte überexprimiert werden konnten, wurden alle mit den jeweiligen Konstrukten transduzierten Zellen im Dejodase-Aktivitäts-Assay getestet (Abb. 3-14 B). Dieser konnte jedoch den damals

beobachteten Effekt der Induktion der DIO1-Aktivität in RNMTL1-Wt überexprimierenden HepG2-Zellen nicht reproduzieren.

Folglich wurde auf die konventionelle stabile Transfektionsmethode entsprechend der damaligen Versuchsdurchführung zurückgegriffen und es konnten alle RNMTL1-Konstrukte überexprimiert werden (Abb. 3-15). Im folgenden Dejodase-Assay zeigte der damals getestete Zellklon FL11 eine Induktion der DIO1-Aktivität, die Vektorkontrolle aber auch (Abb. 3-16). Weiterhin zeigten nur einige der RNMTL1-überexprimierenden Zellklone eine ähnlich induzierte DIO1-Aktivität, wobei die RNMTL1 selbst scheinbar nicht die Induktion der DIO1-Aktivität bedingt. Die Werte aller Konstrukte-überexprimierenden Zellklone waren auch hier nicht aussagekräftig, ausgenommen die der Del-L7Ae überexprimierenden Zellklone, welche alle gleichmäßig eine geringe DIO1-Aktivität entsprechend der Negativkontrollen zeigten. Die Western Blot-Analyse und deren Quantifizierung für DIO1, von denselben HepG2-Zellproben, bestätigten die Aktivitätswerte (Abb. 3-17). Die Analysen zweier weiterer Selenoproteine, auf einen eventuellen Einfluss von RNMTL1 bzw. dessen Mutanten, ließen ebenfalls ein willkürliches Expressionsmuster mit Unterschieden innerhalb der Gruppen detektieren (Abb. 3-17). Selbst die Mutante Del-L7Ae schien keinen Effekt wie auf die DIO1-Expression zu haben.

Es deutet darauf hin, dass die RNMTL1-Überexpression nicht den erwarteten Einfluss auf die Expression der stressbezogener Selenoproteine in den HepG2-Zellen hat. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Expressionslevel der analysierten Selenoproteine innerhalb der Zellklongruppen könnte eine willkürliche Stimulierung der Expression von Proteinen sein. Dass die Vektorkontrolle einen der höchsten Expressionslevel und im Vergleich zur Negativkontrolle eine doppelt hohe DIO1-Aktivität zeigte, stützt diese Erklärung und unterstreicht, dass die Induktion der DIO1-Expression nicht durch die RNMTL1 bedingt ist. Die mittlerweile publizierte Funktion von RNMTL1 (auf die in Abschnitt 4.2.4. genauer eingegangen wird) als eine humane mitochondriale Methyltransferase, welche für die Biogenese und Funktion der großen mitochondrialen Ribosomenuntereinheit essentiell ist (Rorbach *et al.* 2014), erklärt diese unerwarteten willkürlichen Werte bzw. den fehlenden erwarteten Effekt. Einen scheinbar reduzierenden Effekt, zumindest auf die DIO1-Expression, bedingt durch die Mutante Del-L7Ae, ist aber vorhanden. Ein zufällig gleichmäßiger reduzierender Effekt bei allen fünf Zellklonen ist jedenfalls unwahrscheinlich. Das L7Ae-RNA-Bindemotiv ist zuständig für die Bindung an *kink-*

turn Strukturen, die im Ribosom (Hamma und Ferre-D'Amare 2004; Huang und Lilley 2013), aber auch im SECIS-Element lokalisiert sind (Kinzy *et al.* 2005). In Anbetracht dessen könnte der reduzierende Effekt auf die DIO1-Expression in den untersuchten Zellklonen auch ein Hinweis darauf sein, dass die RNMTL1 auch eine weitere Funktion außerhalb des Mitochondriums haben könnte und doch in der Selenoproteinbiosynthese involviert ist. Eine gestörte Selenoproteinexpression wäre dann anzunehmen. Des Weiteren könnte, bezüglich der bekannten Funktion von RNMTL1 im Mitochondrium, durch das Fehlen des L7Ae-RNA-Bindemotivs die mitochondriale Proteinbiosynthese gestört sein. Das könnte eine generelle schädigende Wirkung auf die Zelle und deren Funktionen haben, wodurch man die reduzierte DIO1-Expression erklären könnte. Die Anmerkung, dass in beiden Fällen die ebenfalls vorhandene endogene RNMTL1 die reguläre Funktion aufrechterhält, könnte man mit einer Kompetition durch die überexprimierte Del-L7Ae-Mutante erklären. Jedoch lässt die demgegenüber hohe DIO1-Expression der Vektorkontrolle viele Fragen offen.

4.2.2. Rekombinante Expression und Aufreinigung von RNMTL1 und Interaktionsstudie mit der tRNA^{Sec} *in vitro*

4.2.2.1. Rekombinante Expression und Aufreinigung

Wie in Abschnitt 4.1.3.1 für SECp43 beschrieben, verhielt sich die rekombinante Proteinexpression und affinitätschromatographische Aufreinigung ebenso für RNMTL1. Die Analysen ließen fast das gleiche Muster an Kontaminanten wie bei SECp43 beobachten (Abb. 3-18 A). Die entsprechende Diskussion ist deshalb dem Abschnitt 4.1.3.1 zu entnehmen. Die weitere Aufreinigung von RNMTL1 war ebenfalls zu der von SECp43 identisch und konnte ebenso den Reinheitsgrad der rekombinanten RNMTL1 steigern (Abb. 3-18 B).

Die RNMTL1 wurde in Form von sechs Banden detektiert. Dabei ist anzunehmen, dass die größte Bande bei ca. 53 kDa das vollständige Protein mit anhängendem His-Tag darstellt, da die endogene RNMTL1 der HepG2-Zellen bei einer Größe von ca. 51 kDa detektiert wurde (siehe Abbildung 3-14 A + 3-15). Es liegt nahe, dass die kleineren fünf Banden trunkierte Formen der RNMTL1 darstellen, jedoch alle aufgrund der Anti-His-Antikörper-Detektion den C-terminalen His-Tag besitzen. Auch

hier kann somit bei den trunkierten Formen ein N-terminaler Teil proteolytisch abgespalten worden sein. Diese trunkierten Formen könnten, von der Größe ausgehend, den Deletionskonstrukten der stabil transfizierten HepG2-Zellen (Abb. 3-13 + 3-15) strukturell ähneln, da deren Deletionen ebenfalls vom N-Terminus ausgingen. So wäre die zweitgrößte Bande als die prozessierte RNMTL1 (Del-MTS) nach Transport ins Mitochondrium zu deuten, auf den im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird. Wie in Abschnitt 4.1.3.1 bereits erwähnt, ist die durch Proteolyse bedingte Trunkierung von Proteinen bei rekombinanter Expression in *E.coli* nicht selten und kann sogar zur Vorbeugung vor Degradation protektiv sein (Seong *et al.* 2004).

4.2.2.2. Interaktion von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec} *in vitro*

Die Bindungsanalyse von RNMTL1 mit der tRNA^{Sec} im REMSA ergab nur ein sehr schwaches Signal, das auf eine schwache Bindung hindeuten könnte (Abb. 3-19). Jedoch war das Signal auf der gleichen Höhe wie das der Bindung von SECp43 mit der tRNA^{Sec} (Abb. 3-10 A). Dieser Fakt und der, dass die aufgereinigte, rekombinante RNMTL1 entsprechend dem rekombinanten SECp43 nicht frei von den typischen *E.coli*-Kontaminanten war, könnte in beiden Fällen erst recht die Vermutung einer unspezifischen Bindung aufkommen lassen. Es könnte aber auch eine unspezifische Bindung unabhängig der Befunde von SECp43 der Grund sein.

4.2.3. RNMTL1 wird in das Mitochondrium transportiert

Da die RNMTL1 eine N-terminale MTS besitzt und zudem vom RNMTL1-spezifischen Antikörper HPA022534 in den Mitochondrien der Zelllinien U-2 OS, A-431 und U-251 MG laut Herstellerangaben immunohistochemisch detektiert wird (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140374-ETFA/subcellular>), liegt ein Transport von RNMTL1 ins Mitochondrium nahe. Diese Annahme konnte bestätigt werden. Eine Western Blot-Analyse von Proben nach einer Mitochondrienisolation aus HepG2-Zellen mit einem RNMTL1-spezifischen Antikörper zeigte eine eindeutige Anreicherung von RNMTL1 in dem isolierten Mitochondrienpellet (Abb. 3-20). Zudem konnten Importassays in der AG Voos an unserem Institut, in denen der RNMTL1-Wt

sowie die Mutante Del-MTS getestet wurden, den Transport in die Mitochondrien nachweisen (Abb. 3-21 A+B). Dieser hing vom Membranpotenzial ab.

4.2.4. RNMTL1 ist nicht die vermutete 2'O-Methyltransferase der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um

Aufgrund der gewonnenen Daten, dass die RNMTL1 nicht den erwarteten Effekt auf die Expression stressbezogener Selenoproteine zeigte und keine eindeutige Interaktion mit der tRNA^{Sec} im REMSA beobachten ließ, muss man von der Hypothese der RNMTL1 als Kandidat für die gesuchte 2'O-Methyltransferase der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um absehen. Nachdem die Experimente bezüglich des RNMTL1-Projekts dieser Arbeit bereits durchgeführt wurden, identifizierten Lee et al. die RNMTL1 neben MRM1 und MRM2 als ein Mitglied der rRNA-Methyltransferasefamilie, welche vermutlich für die drei bekannten 2'O-Ribose-Modifikationen des 16S rRNA-Kerns der großen mitochondrialen Ribosomenunterheit zuständig sind (Lee et al. 2013). Die RNMTL1, mittlerweile oft auch als MRM3 (*rRNA methyltransferase 3, mitochondrial*; kodiert vom *RNMTL1*-Gen) bezeichnet, ist weiterhin 2014 als eine humane mitochondriale Methyltransferase verifiziert worden, die essentiell für die Biogenese und Funktion der großen mitochondrialen Ribosomenuntereinheit ist, (Rorbach et al. 2014), in dem sie die 2'O-Ribose des Guanosins an der Stelle 1370 des 16S rRNA-Kerns methyliert (Lee und Bogenhagen 2014). Diese Befunde sind konsistent mit den erzielten Ergebnissen des Transports von RNMTL1 in die Mitochondrien. Die Hypothese, die RNMTL1 ist die gesuchte 2'O-Methyltransferase der tRNA^{Sec}-Isoform mcm⁵Um, kann somit ausgeschlossen werden. Als Ausblick für die Identifikation dieser, wäre es naheliegend, den anderen Kandidaten FTSJ1 genauer zu untersuchen. Eine Verbindung dieser zur 2'O-Methylierung von tRNAs konnte bereits gezeigt werden. So ist eine defekte 2'O-Methylierung des Phenylalanin-tRNA Anticodonarms mit Mutationen in FTSJ1 assoziiert, jedoch die genaue Rolle von FTSJ1 bei tRNA^{Sec}-Modifikationen ist bisweilen noch unbekannt (Guy et al. 2015).

5. Schlussfolgerung

Eine Beteiligung von SECp43 an der Selenoproteinbiosynthese kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden. Die bereits publizierten Ergebnisse, die beobachtete Interaktion von SECp43 mit der tRNA^{Sec} *in vivo* sowie mit anderen Faktoren im Komplex *in vitro*, die Assoziation von SECp43 mit der heute als Sepsecs bekannten Selenocysteinsynthase, die *knockdown*-Experimente von *Secp43* in NIH3T3-Zellen und zuletzt die Bindungsstudien dieser Arbeit deuten auf eine Rolle von SECp43 innerhalb der Selenoproteinbiosynthese hin. Die Bindungsstudien müssten jedoch weitergeführt und die bisherigen Ergebnisse verifiziert werden.

Hinsichtlich der Charakterisierung der Mausmutanten lässt sich schlussfolgern, dass SECp43 scheinbar keinen Einfluss auf die Selenoproteinbiosynthese in der Leber und dem Gehirn von Mäusen hat. Es wäre jedoch sinnvoll, zur Verifikation dieses Befunds eine weitere *Secp43*-Mausmutante zu generieren, bei der mehr Exons bzw. ein größerer Abschnitt von *Secp43*, inklusive der beiden RRM-Domänen bzw. die zweite RRM-Domäne und die Tyr-reiche Region gleichzeitig, inaktiviert wären. Die Nicht-Funktionalität von SECp43 wäre somit sichergestellt und einige noch offene Fragen könnten geklärt werden. Da die konstitutive Inaktivierung von SECp43 in Mäusen embryonal letal war, muss SECp43 jedoch in einem spezifischen Zelltyp essentiell sein. Eine neue Funktion von SECp43 zu finden, geht allerdings weit über die Zielsetzung dieser Arbeit hinaus.

In Bezug zur Fragestellung von RNMTL1 als mögliche 2'-O-Methyltransferase der tRNA^{Sec} kann RNMTL1 ausgeschlossen werden. Es konnte keine Interaktion zwischen der RNMTL1 und der tRNA^{Sec} sowie auch kein induzierender Effekt von überexprimierter RNMTL1 auf stressbezogene Selenoproteine beobachtet werden. Während der experimentellen Phase dieser Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe die RNMTL1 als ein Mitglied der rRNA-Methyltransferasefamilie identifiziert, die verantwortlich für die drei bekannten 2'-O-Ribose-Modifikationen des 16S rRNA-Kerns der großen mitochondrialen Ribosomenunterheit zu sein scheint. Der nachgewiesene Import von RNMTL1 in die Mitochondrien konnte diesen Befund bestätigen. Die FTSJ1 als weiterer Kandidat für die 2'-O-Methyltransferase müsste als nächstes genauer untersucht werden. Aufgrund von bereits publizierten Daten ist

diese scheinbar mit einer 2'-O-Methylierung des Anticodonarms einer tRNA, in diesem Fall der Phenylalanin-tRNA, assoziiert.

6. Literaturverzeichnis

- Aldosary, B. M., M. E. Sutter, M. Schwartz, and B. W. Morgan. 2012. Case series of selenium toxicity from a nutritional supplement. *Clin Toxicol (Phila)* 50 (1):57-64.
- Allmang, C., L. Wurth, and A. Krol. 2009. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1415-23.
- Anantharaman, V., E. V. Koonin, and L. Aravind. 2002. SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4 (1):71-5.
- Andersen, K. R., N. C. Leksa, and T. U. Schwartz. 2013. Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins* 81 (11):1857-61.
- Angstwurm, M. W., L. Engelmann, T. Zimmermann, C. Lehmann, C. H. Spes, P. Abel, R. Strauss, A. Meier-Hellmann, R. Insel, J. Radke, J. Schuttler, and R. Gartner. 2007. Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med* 35 (1):118-26.
- Arner, E. S. 2010. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* 316 (8):1296-303.
- Behne, D., and A. Kyriakopoulos. 1993. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. *Am J Clin Nutr* 57 (2 Suppl):310S-312S.
- Bermano, G., F. Nicol, J. A. Dyer, R. A. Sunde, G. J. Beckett, J. R. Arthur, and J. E. Hesketh. 1995. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311 (Pt 2):425-30.
- Berry, M. J., L. Banu, Y. Y. Chen, S. J. Mandel, J. D. Kieffer, J. W. Harney, and P. R. Larsen. 1991. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353 (6341):273-6.
- Böck, A., K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, and F. Zinoni. 1991. Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 5 (3):515-20.
- Bolanos-Garcia, V. M., and O. R. Davies. 2006. Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1760 (9):1304-13.
- Bosl, M. R., K. Takaku, M. Oshima, S. Nishimura, and M. M. Taketo. 1997. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (11):5531-4.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Budiman, M. E., J. L. Bubenik, A. C. Miniard, L. M. Middleton, C. A. Gerber, A. Cash, and D. M. Driscoll. 2009. Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol Cell* 35 (4):479-89.
- Burk, R. F., and K. E. Hill. 2005. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 25:215-35.
- Burk, R. F., K. E. Hill, and A. K. Motley. 2001. Plasma selenium in specific and non-specific forms. *Biofactors* 14 (1-4):107-14.
- Carlson, B. A., M. E. Moustafa, A. Sengupta, U. Schweizer, R. Shrimali, M. Rao, N. Zhong, S. Wang, L. Feigenbaum, B. J. Lee, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2007. Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34. *J Biol Chem* 282 (45):32591-602.

- Carlson, B. A., X. M. Xu, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2005. Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem* 280 (7):5542-8.
- Carlson, B. A., X. M. Xu, G. V. Kryukov, M. Rao, M. J. Berry, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2004. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (35):12848-53.
- Chapple, C. E., and R. Guigo. 2008. Relaxation of selective constraints causes independent selenoprotein extinction in insect genomes. *PLoS One* 3 (8):e2968.
- Chavatte, L., B. A. Brown, and D. M. Driscoll. 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 12 (5):408-16.
- Chittum, H. S., K. E. Hill, B. A. Carlson, B. J. Lee, R. F. Burk, and D. L. Hatfield. 1997. Replenishment of selenium deficient rats with selenium results in redistribution of the selenocysteine tRNA population in a tissue specific manner. *Biochim Biophys Acta* 1359 (1):25-34.
- Choi, I. S., A. M. Diamond, P. F. Crain, J. D. Kolker, J. A. McCloskey, and D. L. Hatfield. 1994. Reconstitution of the biosynthetic pathway of selenocysteine tRNAs in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 33 (2):601-5.
- Chomczynski, P., and M. Rymaszewski. 2006. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *Biotechniques* 40 (4):454, 456, 458.
- Cone, J. E., R. M. Del Rio, J. N. Davis, and T. C. Stadtman. 1976. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (8):2659-63.
- Copeland, P. R., J. E. Fletcher, B. A. Carlson, D. L. Hatfield, and D. M. Driscoll. 2000. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J* 19 (2):306-14.
- Diamond, A. M., I. S. Choi, P. F. Crain, T. Hashizume, S. C. Pomerantz, R. Cruz, C. J. Steer, K. E. Hill, R. F. Burk, J. A. McCloskey, and D. L. Hatfield. 1993. Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *J Biol Chem* 268 (19):14215-23.
- Ding, F., and P. J. Grabowski. 1999. Identification of a protein component of a mammalian tRNA(Sec) complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. *RNA* 5 (12):1561-9.
- Diwadkar-Navsariwala, V., and A. M. Diamond. 2004. The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins. *J Nutr* 134 (11):2899-902.
- Donovan, J., K. Caban, R. Ranaweera, J. N. Gonzalez-Flores, and P. R. Copeland. 2008. A novel protein domain induces high affinity selenocysteine insertion sequence binding and elongation factor recruitment. *J Biol Chem* 283 (50):35129-39.
- Donovan, J., and P. R. Copeland. 2009. Evolutionary history of selenocysteine incorporation from the perspective of SECIS binding proteins. *BMC Evol Biol* 9:229.
- Fagegaltier, D., N. Hubert, K. Yamada, T. Mizutani, P. Carbon, and A. Krol. 2000. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J* 19 (17):4796-805.
- Fagegaltier, D., A. Lescure, R. Walczak, P. Carbon, and A. Krol. 2000. Structural analysis of new local features in SECIS RNA hairpins. *Nucleic Acids Res* 28 (14):2679-89.
- Fletcher, J. E., P. R. Copeland, D. M. Driscoll, and A. Krol. 2001. The selenocysteine incorporation machinery: interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. *RNA* 7 (10):1442-53.
- Flohe, L. 2009. The labour pains of biochemical selenology: the history of selenoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1389-403.
- Flohe, L., and W. A. Gunzler. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114-21.
- Flohe, L., W. A. Gunzler, and H. H. Schock. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32 (1):132-4.

- Florian, S., S. Krehl, M. Loewinger, A. Kipp, A. Banning, S. Esworthy, F. F. Chu, and R. Brigelius-Flohe. 2010. Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radic Biol Med* 49 (11):1694-702.
- Fradejas, N., B. A. Carlson, E. Rijntjes, N. P. Becker, R. Tobe, and U. Schweizer. 2013. Mammalian Trt1 is a tRNA([Ser]Sec)-isopentenyl transferase required for full selenoprotein expression. *Biochem J* 450 (2):427-32.
- Gagnon, K. T., and E. S. Maxwell. 2011. Electrophoretic mobility shift assay for characterizing RNA-protein interaction. *Methods Mol Biol* 703:275-91.
- Ganichkin, O. M., E. A. Anedchenko, and M. C. Wahl. 2011. Crystal structure analysis reveals functional flexibility in the selenocysteine-specific tRNA from mouse. *PLoS One* 6 (5):e20032.
- Gobler, C. J., A. V. Lobanov, Y. Z. Tang, A. A. Turanov, Y. Zhang, M. Doblin, G. T. Taylor, S. A. Sanudo-Wilhelmy, I. V. Grigoriev, and V. N. Gladyshev. 2013. The central role of selenium in the biochemistry and ecology of the harmful pelagophyte, *Aureococcus anophagefferens*. *ISME J* 7 (7):1333-43.
- Goldberg, A. L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426 (6968):895-9.
- Grosjean, H., J. Edqvist, K. B. Straby, and R. Giege. 1996. Enzymatic formation of modified nucleosides in tRNA: dependence on tRNA architecture. *J Mol Biol* 255 (1):67-85.
- Grundner-Culemann, E., G. W. Martin, 3rd, J. W. Harney, and M. J. Berry. 1999. Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes. *RNA* 5 (5):625-35.
- Guimaraes, M. J., D. Peterson, A. Vicari, B. G. Cocks, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, D. A. Ferrick, R. A. Kastelein, J. F. Bazan, and A. Zlotnik. 1996. Identification of a novel seld homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (26):15086-91.
- Gupta, N., L. W. DeMong, S. Banda, and P. R. Copeland. 2013. Reconstitution of selenocysteine incorporation reveals intrinsic regulation by SECIS elements. *J Mol Biol* 425 (14):2415-22.
- Guy, M. P., M. Shaw, C. L. Weiner, L. Hobson, Z. Stark, K. Rose, V. M. Kalscheuer, J. Gecz, and E. M. Phizicky. 2015. Defects in tRNA Anticodon Loop 2'-O-Methylation Are Implicated in Nonsyndromic X-Linked Intellectual Disability due to Mutations in FTSJ1. *Hum Mutat*.
- Hagervall, T. G., J. U. Ericson, K. B. Esberg, J. N. Li, and G. R. Bjork. 1990. Role of tRNA modification in translational fidelity. *Biochim Biophys Acta* 1050 (1-3):263-6.
- Hamma, T., and A. R. Ferre-D'Amare. 2004. Structure of protein L7Ae bound to a K-turn derived from an archaeal box H/ACA sRNA at 1.8 Å resolution. *Structure* 12 (5):893-903.
- Hatfield, D., and A. Diamond. 1993. UGA: a split personality in the universal genetic code. *Trends Genet* 9 (3):69-70.
- Hatfield, D. L., B. A. Carlson, X. M. Xu, H. Mix, and V. N. Gladyshev. 2006. Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81:97-142.
- Hatfield, D. L., and V. N. Gladyshev. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22 (11):3565-76.
- Hatfield, D. L., V. N. Gladyshev, J. M. Park, S. I. Park, H. S. Chittum, J. R. Huh, B.A. Carlson, M. Kim, M. E. Moustafa, and B. J. Lee. 1999. Biosynthesis of selenocysteine and its incorporation into protein as the 21st amino acid. *Comprehensive natural products chemistry* 4:353–380.
- Hatfield, D., B. J. Lee, L. Hampton, and A. M. Diamond. 1991. Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA[Ser]Sec population in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19 (4):939-43.
- Hoefig, C. S., K. Renko, J. Kohrle, M. Birringer, and L. Schomburg. 2011. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *J Nutr Biochem* 22 (10):945-55.

- Hoffmann, P. R., S. C. Hoge, P. A. Li, F. W. Hoffmann, A. C. Hashimoto, and M. J. Berry. 2007. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res* 35 (12):3963-73.
- Huang, L., and D. M. Lilley. 2013. The molecular recognition of kink-turn structure by the L7Ae class of proteins. *RNA* 19 (12):1703-10.
- Jung, J. E., V. Karoor, M. G. Sandbaken, B. J. Lee, T. Ohama, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, G. T. Mullenbach, K. E. Hill, A. J. Wahba, and et al. 1994. Utilization of selenocysteyl-tRNA[Ser]Sec and seryl-tRNA[Ser]Sec in protein synthesis. *J Biol Chem* 269 (47):29739-45.
- Kasaikina, M. V., D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2012. Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. *Biochim Biophys Acta* 1823 (9):1633-42.
- Kim, L. K., T. Matsufuji, S. Matsufuji, B. A. Carlson, S. S. Kim, D. L. Hatfield, and B. J. Lee. 2000. Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA[Ser]Sec is governed by both primary and tertiary structure. *RNA* 6 (9):1306-15.
- Kim, S. H., J. L. Sussman, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, A. H. Wang, N. C. Seeman, and A. Rich. 1974. The general structure of transfer RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (12):4970-4.
- Kinzy, S. A., K. Caban, and P. R. Copeland. 2005. Characterization of the SECIS binding protein 2 complex required for the co-translational insertion of selenocysteine in mammals. *Nucleic Acids Res* 33 (16):5172-80.
- Köhrle, J. 1999. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* 81 (5):527-33.
- Kryukov, G. V., S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo, and V. N. Gladyshev. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300 (5624):1439-43.
- Kuiper, G. G., F. Wassen, W. Klootwijk, H. Van Toor, E. Kaptein, and T. J. Visser. 2003. Molecular basis for the substrate selectivity of cat type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 144 (12):5411-21.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-5.
- Lamichhane, T. N., N. H. Blewett, and R. J. Maraia. 2011. Plasticity and diversity of tRNA anticodon determinants of substrate recognition by eukaryotic A37 isopentenyltransferases. *RNA* 17 (10):1846-57.
- Lee, B. J., P. J. Worland, J. N. Davis, T. C. Stadtman, and D. L. Hatfield. 1989. Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem* 264 (17):9724-7.
- Lee, K. W., and D. F. Bogenhagen. 2014. Assignment of 2'-O-methyltransferases to modification sites on the mammalian mitochondrial large subunit 16 S ribosomal RNA (rRNA). *J Biol Chem* 289 (36):24936-42.
- Lee, K. W., C. Okot-Kotber, J. F. LaComb, and D. F. Bogenhagen. 2013. Mitochondrial ribosomal RNA (rRNA) methyltransferase family members are positioned to modify nascent rRNA in foci near the mitochondrial DNA nucleoid. *J Biol Chem* 288 (43):31386-99.
- Lener, M., M. Muszynska, A. Jakubowska, K. Jaworska-Bieniek, G. Sukiennicki, K. Kaczmarek, K. Durda, T. Gromowski, P. Serrano-Fernandez, J. Kladny, A. Wiechowska-Kozłowska, T. Grodzki, E. Jaworowska, J. Lubinski, B. Gorecka-Szyld, G. Wilk, T. Huzarski, T. Byrski, C. Cybulski, J. Gronwald, T. Debniak, O. Ashuryk, A. Toloczko-Grabarek, A. Morawski, and R. J. Scott. 2015. Selenium as a marker of cancer risk and of selection for control examinations in surveillance. *Contemp Oncol (Pozn)* 19 (1A):A60-1.
- Low, S. C., E. Grundner-Culemann, J. W. Harney, and M. J. Berry. 2000. SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *EMBO J* 19 (24):6882-90.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1):265-75.

- Mahdi, Y., X. M. Xu, B. A. Carlson, N. Fradejas, P. Gunter, D. Braun, E. Southon, L. Tessarollo, D. L. Hatfield, and U. Schweizer. 2015. Expression of Selenoproteins Is Maintained in Mice Carrying Mutations in SECp43, the tRNA Selenocysteine 1 Associated Protein (Trna^{u1ap}). *PLoS One* 10 (6):e0127349.
- Maia, A. L., I. M. Goemann, E. L. Meyer, and S. M. Wajner. 2011. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol* 209 (3):283-97.
- Mariotti, M., A. V. Lobanov, R. Guigo, and V. N. Gladyshev. 2013. SECISearch3 and Sebastian: new tools for prediction of SECIS elements and selenoproteins. *Nucleic Acids Res* 41 (15):e149.
- Martin, G. W., 3rd, J. W. Harney, and M. J. Berry. 1998. Functionality of mutations at conserved nucleotides in eukaryotic SECIS elements is determined by the identity of a single nonconserved nucleotide. *RNA* 4 (1):65-73.
- McKee, A. E., E. Minet, C. Stern, S. Riahi, C. D. Stiles, and P. A. Silver. 2005. A genome-wide in situ hybridization map of RNA-binding proteins reveals anatomically restricted expression in the developing mouse brain. *BMC Dev Biol* 5:14.
- Miniard, A. C., L. M. Middleton, M. E. Budiman, C. A. Gerber, and D. M. Driscoll. 2010. Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res* 38 (14):4807-20.
- Moriarty, P. M., C. C. Reddy, and L. E. Maquat. 1998. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 18 (5):2932-9.
- Moustafa, M. E., and H. A. Antar. 2012. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet* 50 (9-10):736-47.
- Moustafa, M. E., B. A. Carlson, M. A. El-Saadani, G. V. Kryukov, Q. A. Sun, J. W. Harney, K. E. Hill, G. F. Combs, L. Feigenbaum, D. B. Mansur, R. F. Burk, M. J. Berry, A. M. Diamond, B. J. Lee, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2001. Selective inhibition of selenocysteine tRNA maturation and selenoprotein synthesis in transgenic mice expressing isopentenyladenosine-deficient selenocysteine tRNA. *Mol Cell Biol* 21 (11):3840-52.
- Mullenbach, G. T., A. Tabrizi, B. D. Irvine, G. I. Bell, J. A. Tainer, and R. A. Hallewell. 1988. Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathione peroxidases. *Protein Eng* 2 (3):239-46.
- Nelson, A. A., O. G. Fitzhugh, and H. O. Calvery. 1943. Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats Cancer research. *Cancer research* 3:230-236.
- Novoselov, S. V., M. Rao, N. V. Onoshko, H. Zhi, G. V. Kryukov, Y. Xiang, D. P. Weeks, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 21 (14):3681-93.
- Otero, L., L. Romanelli-Cedrez, A. A. Turanov, V. N. Gladyshev, A. Miranda-Vizuete, and G. Salinas. 2014. Adjustments, extinction, and remains of selenocysteine incorporation machinery in the nematode lineage. *RNA* 20 (7):1023-34.
- Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren, and K. K. Khanna. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9 (7):775-806.
- Park, Y. H., Y. H. Jeon, and I. Y. Kim. 2012. Selenoprotein W promotes cell cycle recovery from G2 arrest through the activation of CDC25B. *Biochim Biophys Acta* 1823 (12):2217-26.
- Prigge, J. R., S. Eriksson, S. V. Iverson, T. A. Meade, M. R. Capecchi, E. S. Arner, and E. E. Schmidt. 2012. Hepatocyte DNA replication in growing liver requires either glutathione or a single allele of txnrd1. *Free Radic Biol Med* 52 (4):803-10.
- Raman, A. V., M. W. Pitts, A. Seyedali, A. C. Hashimoto, L. A. Seale, F. P. Bellinger, and M. J. Berry. 2012. Absence of selenoprotein P but not selenocysteine lyase results in severe neurological dysfunction. *Genes Brain Behav* 11 (5):601-13.
- Rayman, M. P. 2012. Selenium and human health. *Lancet* 379 (9822):1256-68.
- Reeves, M. A., F. P. Bellinger, and M. J. Berry. 2010. The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxid Redox Signal* 12 (7):809-18.

- Reeves, M. A., and P. R. Hoffmann. 2009. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci* 66 (15):2457-78.
- Robichon, C., J. Luo, T. B. Causey, J. S. Benner, and J. C. Samuelson. 2011. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl Environ Microbiol* 77 (13):4634-46.
- Rodrigue-Way, A., A. Demers, H. Ong, and A. Tremblay. 2007. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology* 148 (3):1009-18.
- Romagne, F., D. Santesmasses, L. White, G. K. Sarangi, M. Mariotti, R. Hubler, A. Weihmann, G. Parra, V. N. Gladyshev, R. Guigo, and S. Castellano. 2014. SelenoDB 2.0: annotation of selenoprotein genes in animals and their genetic diversity in humans. *Nucleic Acids Res* 42 (Database issue):D437-43.
- Rorbach, J., P. Boesch, P. A. Gammage, T. J. Nicholls, S. F. Pearce, D. Patel, A. Hauser, F. Perocchi, and M. Minczuk. 2014. MRM2 and MRM3 are involved in biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Mol Biol Cell* 25 (17):2542-55.
- Rosenfeld, I., and O. A. Beath. 1945. The elimination and distribution of selenium in the tissues in experimental selenium poisoning. *J Nutr* 30:443-9.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, and W. G. Hoekstra. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179 (4073):588-90.
- Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166 (2):368-79.
- Schomburg, L., C. Riese, K. Renko, and U. Schweizer. 2007. Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. *Biol Chem* 388 (10):1035-41.
- Schomburg, L., and U. Schweizer. 2009. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1453-62.
- Schwarz, K. 1951. A hitherto unrecognized factor against dietary necrotic liver degeneration in American yeast (factor3). *Proc Soc Exp Biol Med* 78 (3):852-6.
- Schwarz, K., and C. M. Foltz. 1999. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition* 15 (3):255.
- Schweizer, U., M. Michaelis, J. Kohrle, and L. Schomburg. 2004. Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem J* 378 (Pt 1):21-6.
- Schweizer, U., F. Streckfuss, P. Pelt, B. A. Carlson, D. L. Hatfield, J. Kohrle, and L. Schomburg. 2005. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J* 386 (Pt 2):221-6.
- Seeher, S., T. Atassi, Y. Mahdi, B. A. Carlson, D. Braun, E. K. Wirth, M. O. Klein, N. Reix, A. C. Miniard, L. Schomburg, D. L. Hatfield, D. M. Driscoll, and U. Schweizer. 2014. Secisbp2 is essential for embryonic development and enhances selenoprotein expression. *Antioxid Redox Signal* 21 (6):835-49.
- Seeher, S., B. A. Carlson, A. C. Miniard, E. K. Wirth, Y. Mahdi, D. L. Hatfield, D. M. Driscoll, and U. Schweizer. 2014. Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. *Biochem J* 462 (1):67-75.
- Seeher, S., Y. Mahdi, and U. Schweizer. 2012. Post-transcriptional control of selenoprotein biosynthesis. *Curr Protein Pept Sci* 13 (4):337-46.
- Sengupta, A., B. A. Carlson, J. A. Weaver, S. V. Novoselov, D. E. Fomenko, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2008. A functional link between housekeeping selenoproteins and phase II enzymes. *Biochem J* 413 (1):151-61.
- Seong, Y. M., H. J. Park, G. H. Seong, J. Y. Choi, S. J. Yoon, B. R. Min, S. Kang, and H. Rhim. 2004. N-terminal truncation circumvents proteolytic degradation of the human HtrA2/Omi serine

- protease in *Escherichia coli*: rapid purification of a proteolytically active HtrA2/Omi. *Protein Expr Purif* 33 (2):200-8.
- Shen, Q., L. Fan, and P. E. Newburger. 2006. Nuclease sensitive element binding protein 1 associates with the selenocysteine insertion sequence and functions in mammalian selenoprotein translation. *J Cell Physiol* 207 (3):775-83.
- Small-Howard, A., N. Morozova, Z. Stoytcheva, E. P. Forry, J. B. Mansell, J. W. Harney, B. A. Carlson, X. M. Xu, D. L. Hatfield, and M. J. Berry. 2006. Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. *Mol Cell Biol* 26 (6):2337-46.
- Songe-Moller, L., E. van den Born, V. Leihne, C. B. Vagbo, T. Kristoffersen, H. E. Krokan, F. Kirpekar, P. O. Falnes, and A. Klungland. 2010. Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding. *Mol Cell Biol* 30 (7):1814-27.
- Squires, J. E., I. Stoytchev, E. P. Forry, and M. J. Berry. 2007. SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol* 27 (22):7848-55.
- Stock, T., and M. Rother. 2009. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1520-32.
- Stosnach, H. 2005. Environmental trace-element analysis using a benchtop total reflection X-ray fluorescence spectrometer. *Anal Sci* 21 (7):873-6.
- Stoytcheva, Z., R. M. Tujebajeva, J. W. Harney, and M. J. Berry. 2006. Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck. *Mol Cell Biol* 26 (24):9177-84.
- Streckfuss, F., I. Hamann, L. Schomburg, M. Michaelis, R. Sapin, M. O. Klein, J. Kohrle, and U. Schweizer. 2005. Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 337 (2):739-45.
- Sturchler, C., A. Lescure, G. Keith, P. Carbon, and A. Krol. 1994. Base modification pattern at the wobble position of *Xenopus* selenocysteine tRNA(Sec). *Nucleic Acids Res* 22 (8):1354-8.
- Sun, X., and L. E. Maquat. 2002. Nonsense-mediated decay: assaying for effects on selenoprotein mRNAs. *Methods Enzymol* 347:49-57.
- Sutter, M. E., J. D. Thomas, J. Brown, and B. Morgan. 2008. Selenium toxicity: a case of selenosis caused by a nutritional supplement. *Ann Intern Med* 148 (12):970-1.
- Suvorova, E. S., O. Lucas, C. M. Weisend, M. F. Rollins, G. F. Merrill, M. R. Capecchi, and E. E. Schmidt. 2009. Cytoprotective Nrf2 pathway is induced in chronically txnrd 1-deficient hepatocytes. *PLoS One* 4 (7):e6158.
- Suzuki, T., V. P. Kelly, H. Motohashi, O. Nakajima, S. Takahashi, S. Nishimura, and M. Yamamoto. 2008. Deletion of the selenocysteine tRNA gene in macrophages and liver results in compensatory gene induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *J Biol Chem* 283 (4):2021-30.
- Tanguy, Y, S Arthaud, A Falluel-Morel, D.L. Manecka, A Chagraoui, I Lihmann, and Y Anouar. 2012. Selenoprotein T In *Selenoproteins and Mimics*
- Advanced Topics in Science and Technology in China.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1989. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27 (8):495-501.
- Tujebajeva, R. M., P. R. Copeland, X. M. Xu, B. A. Carlson, J. W. Harney, D. M. Driscoll, D. L. Hatfield, and M. J. Berry. 2000. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep* 1 (2):158-63.
- Turanov, A. A., V. A. Shchedrina, R. A. Everley, A. V. Lobanov, S. H. Yim, S. M. Marino, S. P. Gygi, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2014. Selenoprotein S is involved in maintenance and transport of multiprotein complexes. *Biochem J* 462 (3):555-65.

- Turner, D. C., and T. C. Stadtman. 1973. Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch Biochem Biophys* 154 (1):366-81.
- Vanderpas, J. B., B. Contempre, N. L. Duale, W. Goossens, N. Bebe, R. Thorpe, K. Ntambue, J. Dumont, C. H. Thilly, and A. T. Diplock. 1990. Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire. *Am J Clin Nutr* 52 (6):1087-93.
- Varlamova, E. G., and V. I. Novoselov. 2012. [The search of partners of a new mammalian selenium-containing protein V (SelV) and expression it's mRNA during ontogenesis and spermatogenesis]. *Mol Biol (Mosk)* 46 (2):276-84.
- Vernie, L. N. 1984. Selenium in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 738 (4):203-17.
- Vidovic, I., S. Nottrott, K. Hartmuth, R. Luhrmann, and R. Ficner. 2000. Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol Cell* 6 (6):1331-42.
- Vinceti, M., G. Dennert, C. M. Crespi, M. Zwahlen, M. Brinkman, M. P. Zeegers, M. Horneber, R. D'Amico, and C. Del Giovane. 2014. Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD005195.
- Walczak, R., P. Carbon, and A. Krol. 1998. An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation. *RNA* 4 (1):74-84.
- Walczak, R., E. Westhof, P. Carbon, and A. Krol. 1996. A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA* 2 (4):367-79.
- Whanger, P. D. 2009. Selenoprotein expression and function-selenoprotein W. *Biochim Biophys Acta* 1790 (11):1448-52.
- Williams, G. R., and J. H. Bassett. 2011. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *J Endocrinol* 209 (3):261-72.
- Wirth, E. K., B. S. Bharathi, D. Hatfield, M. Conrad, M. Brielmeier, and U. Schweizer. 2014. Cerebellar hypoplasia in mice lacking selenoprotein biosynthesis in neurons. *Biol Trace Elem Res* 158 (2):203-10.
- Wirth, E. K., M. Conrad, J. Winterer, C. Wozny, B. A. Carlson, S. Roth, D. Schmitz, G. W. Bornkamm, V. Coppola, L. Tessarollo, L. Schomburg, J. Kohrle, D. L. Hatfield, and U. Schweizer. 2010. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J* 24 (3):844-52.
- Xu, X. M., B. A. Carlson, H. Mix, Y. Zhang, K. Saira, R. S. Glass, M. J. Berry, V. N. Gladyshev, and D. L. Hatfield. 2007. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol* 5 (1):e4.
- Xu, X. M., H. Mix, B. A. Carlson, P. J. Grabowski, V. N. Gladyshev, M. J. Berry, and D. L. Hatfield. 2005. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *J Biol Chem* 280 (50):41568-75.
- Yang, G. Q. 1983. [The relationship between selenium and etiology of Keshan disease]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 14 (4):313-7.
- Yang, G. Q., K. Y. Ge, J. S. Chen, and X. S. Chen. 1988. Selenium-related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. *World Rev Nutr Diet* 55:98-152.
- Yang, G. Q., S. Z. Wang, R. H. Zhou, and S. Z. Sun. 1983. Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* 37 (5):872-81.
- Zinoni, F., A. Birkmann, T. C. Stadtman, and A. Bock. 1986. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (13):4650-4.
- Zou, K., G. Liu, T. Wu, and L. Du. 2009. Selenium for preventing Kashin-Beck osteoarthropathy in children: a meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 17 (2):144-51.

7. Anhang

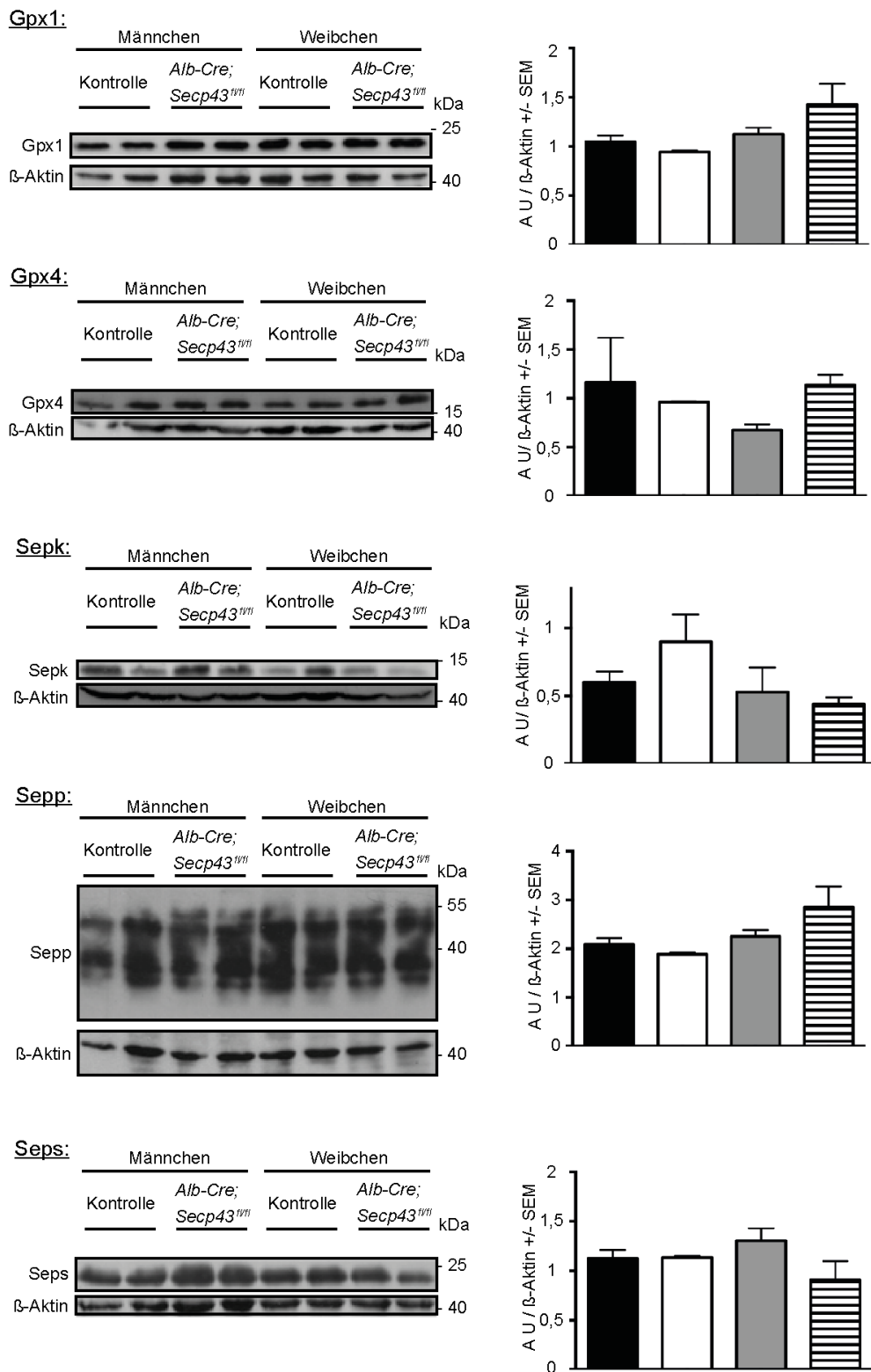


Abbildung 6-1: Western Blot-Analysen der einzelnen Selenoproteine in der Leber der *Alb-Cre*, *Secp43^{fl/fl}*- und Kontrollmäuse mit Quantifizierungen. Die separaten Western Blot-Analysen mit Quantifizierungen zugehörig zu Abbildung 3-3.

Liste der Publikationen und Poster

Publikationen:

1. **Mahdi Y**, Xu XM, Carlson BA, Fradejas N, Günter P, Braun D, Southon E, Tessarollo L, Hatfield DL, Schweizer U (2015) Expression of Selenoproteins is Maintained in Mice Carrying Mutations in SECp43, the tRNA Selenocysteine 1 Associated Protein (*Tmau1ap*). *PLoS One* 10(6):e0127349.
2. Seeher S, Atassi T, **Mahdi Y**, Carlson BA, Braun D, Wirth EK, Klein MO, Reix N, Miniard AC, Schomburg L, Hatfield DL, Driscoll DM, Schweizer U (2014) Secisbp2 is essential for embryonic development and enhances selenoprotein expression. *Antioxid Redox Signal* 21(6):835-49.
3. Seeher S, Carlson BA, Miniard AC, Wirth EK, **Mahdi Y**, Hatfield DL, Driscoll DM, Schweizer U (2014) Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. *Biochem Journal* 462(1):67-75.
4. Seeher S, **Mahdi Y**, Schweizer U (2012) Post-transcriptional control of selenoprotein biosynthesis. *Current Protein & Peptide Science* 13(4):337-46.

Poster:

1. Seeher S, Wirth EK, **Mahdi Y**, Miniard A, Driscoll DM, Carlson BA, Hatfield DL, Schweizer U. SECISBP2 syndrome: Mouse models for an atypical form of resistance to thyroid hormone. Bregenz Summer School on Endocrinology, Bregenz, Österreich, 04.-09.09.2012.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei meinem Mentor und Projektbetreuer Prof. Dr. Ulrich Schweizer herzlichst bedanken, mir die Möglichkeit der erfolgreichen Anfertigung meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe in den beiden interessanten Projekten gegeben zu haben, aus denen eine Publikation als Erstautor hervorging. Seine großartige fachliche Kompetenz sowie seine Fähigkeit mich immer zu motivieren und zu eigenem Denken anzuregen, hat mir die Durchführung meiner Arbeit erleichtert und gewährte mir eine andere Sichtweise bezüglich bestimmter Sachverhalte.

Zudem danke ich Prof. Dr. Josef Köhrle als Leiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion an seinem Institut und für die Aufnahme in das von ihm geleitete DFG Graduiertenkolleg 1208.

Ein sehr herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Gudrun Brockmann für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit an der Humboldt Universität zu Berlin.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Lutz Schomburg für die motivierenden Gespräche, die ständige Verfügbarkeit als Ansprechpartner sowie für die Begutachtung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sandra Seeher und Dr. Noelia Fradejas-Villar, die mich während meiner Arbeitszeit immer unterstützt haben und stets Ansprechpartner sowie gesellige Laborpartner waren. Sandra Seeher, die mich schon während meiner Studienzeit begleitet hat, bin ich speziell dafür sehr dankbar, dass sie mich auf diese Arbeitsgruppe aufmerksam gemacht hat und für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation. Dr. Noelia Fradejas-Villar möchte besonders für die Betreuung und Hilfe bei meiner Experimente danken. Ihr enormes fachliches Wissen und die täglichen anregenden Gespräche waren essentiell für die Durchführung meiner Arbeit und haben mich immer inspiriert. Durch Sie konnte ich mir viel fachliches Wissen aneignen.

Ein großer Dank gilt Dr. Eddy Rintijes für die Hilfe bei der Durchführung wichtiger Experimente, das Korrekturlesen der Arbeit sowie für die ständige Motivation und den Ansporn zur Fertigstellung meiner Dissertation.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Doreen Braun, die ebenfalls stets mein Ansprechpartner war und mich während meiner Arbeit immer unterstützt hat.

Ich möchte mich zudem bei den technischen Assistentinnen Uschi Reuter und Simone Arndt bedanken. Frau Reuter kümmerte sich um alle meine Anliegen und war stets für mich da. Frau Arndt half mir bei der Fertigstellung vieler Experimente.

Dr. med. dent. Paul Günter danke ich für die effiziente und unkomplizierte Mithilfe bei meinem Hauptprojekt im Zuge seiner medizinischen Doktorarbeit.

Allen Kollegen am Institut für Experimentelle Endokrinologie in Berlin und am Institut für Molekularbiologie und Biochemie in Bonn möchte ich ganz besonders für die tolle Atmosphäre, kollegiale Stimmung und die schöne Zeit bedanken. Insbesondere Anja Fischbach, Niels-Peter Becker, Jörg Johannes, Dr. Nicole Pietschmann, Franziska Meyer, Dr. Eva -Katrin Wirth, Mette Stödter, Dr. Kostja Renko, Dr. Peter Hofmann, Katja Schreiber, Tobias Lindenberg, Antje Kretschmer, Ina Lehmphul und Carola Geiler.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem DFG Graduiertenkolleg 1208. Die Weiterbildung und Schulung waren sehr interessant und lehrreich. Mentoren, Betreuern, allen Assoziierten und Stipendiaten möchte ich für die tolle Zeit danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Sie waren immer für mich da und haben mich immer unterstützt und motiviert.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „RNA-bindende Proteine involviert in der Selenoproteinbiosynthese“ selbständig angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel und Literatur vollständig angegeben habe.

Zudem versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch in keiner Form bei einer anderen Prüfungsbehörde bzw. Universität eingereicht wurde und ich nicht im Besitz eines Doktorgrades bin.

Weiterhin erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung sowie das von mir entsprechend angestrebte Verfahren bekannt sind.

Berlin, den.....

.....
Yassin Mahdi